

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura
en la bacteria antártica *Shewanella frigidimarina***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura García Descalzo

Directores

Cristina Cid Sánchez
Javier Arroyo Nombela

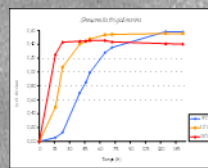
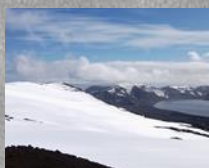
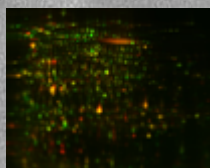
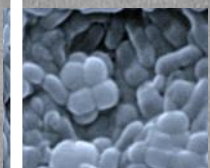
Madrid, 2014



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Dpto. Microbiología II

Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica *Shewanella frigidimarina*

Laura García Descalzo
Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia
Dpto. Microbiología II



Mecanismos moleculares de adaptación a
los cambios de temperatura en la bacteria
antártica *Shewanella frigidimarina*

Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por

Laura García Descalzo

Bajo la dirección de la Doctora
Cristina Cid Sánchez
Y tutela del Doctor
Javier Arroyo Nombela

Madrid, 2013

Dr. Jesús Pla Alonso, Coordinador del programa de Doctorado en Microbiología y Parasitología del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que D^a. **LAURA GARCÍA DESCALZO** ha realizado en el Centro de Astrobiología (CSIC-INTA) el trabajo que se presenta para optar al grado de Doctor con el título: **“Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica *Shewanella frigidimarina*”**, bajo la dirección de la doctora **CRISTINA CID SÁNCHEZ** y la tutela de **JAVIER ARROYO NOMBELA**.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid, 2013

Fdo. Dr. Jesús Pla Alonso

A mi familia y amigos,
a los que están y a los que se fueron.

Gracias...

Quiero mostrar mi agradecimiento a mi directora de tesis Cristina Cid Sánchez por darme la oportunidad allá por el año 2008 y depositar la confianza en mí durante estos años para realizar este trabajo y poder culminar la Tesis Doctoral que ocupa este manuscrito. Gracias por contar conmigo. Gracias por confiar en mí y gracias por brindarme la oportunidad de participar en un proyecto apasionante que nos llevó hasta un paraíso tan inolvidable como la Antártida.

Gracias a mi tutor Javier Arroyo Nombela por su disposición y ayuda en resolver cuantas dudas y problemas se fueron presentando.

Gracias a las Unidades de Proteómica y Genómica del Parque Científico de Madrid y al Servicio de Proteómica del Hospital Ramón y Cajal por su asesoramiento, experiencia y realización de análisis de nuestras muestras.

Gracias a todos los compañeros del Centro de Astrobiología que han contribuido a mi formación, a mi trabajo y a mi conocimiento científico desde el primer día que pisé este centro. Y en especial a mis compañeros de laboratorio Victor y Eva.

Gracias, gracias, gracias.....tengo mucho que agradecer....agradecer y dedicar...

A los superhéroes de la historia de mi vida, de los que no he parado de aprender, imprescindibles, insustituibles, auténticos ejemplos de lo más importante del camino, ser persona, y a los que me une algo encantadoramente irremediable. Os admiro.

PAPÁ, MAMÁ, HERMONA, FER, VICTOR, JORGE

Y a los mejores mortales que habéis llenado el camino hasta aquí, que con pequeña o gran aportación habéis contribuido a que esto esté sucediendo (llenando el camino) con vuestros empujones, ánimos, ayuda, amenazas de colleja, consejos, preocupación, cariño, kits de laboratorio, trueques y más!!, abrazos, conversaciones, muchas conversaciones, con todo el tiempo dedicado, con vuestros conocimientos y experiencia, vuestras manos, vuestro trabajo, con muchas risas y carcajadas, un enorme positivismo y más empujones....Por compartir conmigo esta locura y todo este tiempo.

Unos llegasteis antes, otros más tarde, algunos ya no estáis en escena y otros os habéis hecho un Magnífico hueco en ella. Quizá no lo sabéis pero a todos vosotros tengo algo o mucho que agradecer.

Gracias por vuestras lecciones y por no dejar que me detenga.

MIRIAM, LUIS, FER, ALEX, GERSON, RICARDO, MIRIAM C., PATXI, MAGDALENA, FRAN, DAVID, JANA, ANTONIO MOLINA, FER CAMPS., MANOLO, JOSE Mª, ESTHER, CAROLINA, FELIPE, ALMU, DOC, VICTOR C., ANDRÉS, TATIANA, NICO, MARTA, FER, CHEMA, ALBA, EVA, OLGA, PATT, JUAN ANGEL, ADOLFO, ISABEL, NATALIA, ALI, JOSE MANUEL, LOLI, PERICO, PIPO.

Gracias a **TODOS**, superhéroes y mortales, por aguantarme, por quererme y demostrármelo, por apoyarme, enriquecerme, acompañarme y por vuestra incondicional e inquebrantable confianza en mí.

Tengo que volver a destacar a dos personas sin las que difícilmente, además de mi familia, esto no estaría pasando hoy, sin ellos no creo que hubiera llegado hasta el final:

Miriam, muy pocas personas en mi vida he conocido con un corazón tan grande como el tuyo y con ese instinto de cuidar, proteger, preocuparte y darlo todo por la gente a la que quieres y yo tengo la suerte de estar entre tu gente.

Jorge, eres espectacular. Gracias por tu apoyo y tu amor desinteresados, por detenerte a conocerme y valorarme. Y gracias por todo lo que me has enseñado.

"La adaptabilidad, más que ningún otro rasgo,
es esencial para la vida en situaciones extremas "
(Ernest Shackleton).

Todo parece imposible hasta que se hace.
(Nelson Mandela).

Abstract	1
ABREVIATURAS	5
Introducción	7
1. Los límites de la vida	9
1. 2. Extremófilos	10
2. Un planeta frío	12
2. 1. Psicrófilos: Vida a bajas temperaturas	14
2. 1. 1. Adaptación de los psicrófilos a su hábitat frío	15
2. 1. 2. Psicrófilos vs. Mesófilos	19
3. Principales características de los géneros <i>Shewanella</i> y <i>Psychrobacter</i>	20
3. 1. El género <i>Shewanella</i>	20
3. 2. El género <i>Psychrobacter</i>	21
4. Especies bacterianas estudiadas. Descripción y caracterización	23
4. 1. <i>Shewanella oneidensis</i>	25
4. 2. <i>Shewanella frigidimarina</i>	26
4. 3. <i>Psychrobacter frigidicola</i>	27
5. Proteínas de adaptación. Chaperonas	29
5. 1. Proteínas de choque térmico (Hsp)	31
5. 1. 1. Familia Hsp70. DnaK y su cofactor DnaJ	34
5. 1. 2. Familia Hsp 60. El sistema GroEL/GroES	36
Objetivos y planteamientos	39
Materiales y métodos	43
1. Especies bacterianas de estudio	45
2. Condiciones y medios de cultivo	45
2. 1. Condiciones de cultivo	45
2. 2. Medios de cultivo	47
3. Clonaje y secuenciación	47
3. 1. Extracción de ADN genómico	47
3. 2. Amplificación	47
3. 3. Ligación	48
3. 4. Transformación	48
3. 5. Selección y cultivo de colonias transformadas	48
3. 6. Extracción del ADN plasmídico y reacción de secuenciación	48
4. Observación microscópica de los cultivos	49
4. 1. Microscopía óptica	49

Indice

4. 2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	49
5. Obtención del ARN total.	50
5. 1. Extracción de ARN total.	50
5. 2. Tratamiento enzimático con Dnasa I.	50
5. 3. Análisis de la integridad y calidad del ARN.	51
6. Extracción de proteínas.	51
7. RT-PCR cuantitativa.	52
7. 1. Síntesis de ADNc.	52
7. 2. Diseño de primers.	53
7. 3. Ensayo de la eficiencia de primers.	55
7. 4. Cuantificación relativa.	55
7. 5. Cuantificación de la expresión génica.	56
8. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida e inmunodetección mediante western-blot.	57
8. 1. Preparación de las muestras.	57
8. 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	57
8. 3 Transferencia de proteínas.	57
8. 4. Inmunodetección.	58
8. 5. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.	58
9. Tinción con plata en condiciones compatibles con MALDI-TOF.	59
10. Inmunoprecipitación de proteínas.	60
11. Electroforesis bidimensional.	61
11. 1 Electroforesis diferencial bidimensional en gel (2D-DIGE) de extracto de proteína total.	61
11. 1. 1. Preparación de muestras.	61
11. 1 .2. Marcaje de las muestras.	61
11. 1. 3. Primera dimensión.	61
11. 1. 4. Segunda dimensión.	62
11. 1. 5. Análisis de imágenes DIGE.	62
11. 2. Electroforesis bidimensional de extractos inmunoprecipitados.	63
11. 2. 1. Limpieza de muestras.	64
11. 2. 2. Primera dimensión.	64
11 . 2. 3. Equilibrado.	64
11 . 2. 4. Segunda dimensión.	64
11. 2. 5. Tinción, captura de imágenes e identificación por espectrometría de masas.	65

Resultados.....	67
1. Principales características microscópicas y moleculares de las especies de estudio y su crecimiento en función de la temperatura.	69
1. 1. Crecimiento de especies bacterianas en función de la temperatura.	69
1. 2. Observación de la morfología celular.	72
1. 3. Cambios en el perfil electroforético de extractos de proteínas en las tres especies a distintas temperaturas de crecimiento.	73
2. Niveles de expresión de las chaperonas GroEL, DnaK y sus chaperoninas GroES y DnaJ en las especies estudiadas en función de la temperatura.	75
2. 1. Cuantificación relativa de la expresión génica de chaperonas en cultivos de 4°C y 30°C en <i>Shewanella oneidensis</i> y <i>Shewanella frigidimarina</i>	75
2. 1. 1. Análisis de expresión génica diferencial entre los grupos de muestras de 4°C y 30°C según el método del ΔCt	76
2. 2. Inmunodetección de Hsps mediante western-blot.	78
3. Diferencias en el proteoma total en dos condiciones de temperatura alejadas.	81
3. 1. Análisis de electroforesis bidimensional diferencial de <i>Shewanella oneidensis</i> a 4°C y 30°C.	81
3. 2. Análisis de electroforesis bidimensional diferencial de <i>Shewanella frigidimarina</i> . ..	89
3. 3. Análisis de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) de <i>Psychrobacter frigidicola</i> a 4°C y 30°C.	97
3. 4. Comparación de la expresión diferencial de las proteínas en común encontradas en las tres especies.	104
4. Interacciones de proteínas con las principales chaperonas estudiadas.	105
4. 1. Proteínas identificadas mediante electroforesis no desnaturizante en <i>Shewanella oneidensis</i>	105
4. 2. Electroforesis bidimensional de proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos frente a la principales chaperonas GroEL y DnaK en las tres especies de estudio. ...	106
4. 2. 1. Identificación de proteínas que interaccionan <i>in vivo</i> con GroEL en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en <i>Shewanella oneidensis</i>	107
4. 2. 2. Identificación de proteínas que interaccionan <i>in vivo</i> con DnaK en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en <i>Shewanella oneidensis</i>	109
4. 2. 3. Identificación de que interaccionan <i>in vivo</i> con GroEL en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en <i>Shewanella frigidimarina</i>	111
4. 2. 4. Identificación de proteínas que interaccionan <i>in vivo</i> con DnaK en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en <i>Shewanella frigidimarina</i>	113
4. 2. 5. Identificación de proteínas que interaccionan <i>in vivo</i> con GroEL en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en <i>Psychrobacter frigidicola</i>	115
4. 2. 6. Identificación de proteínas que interaccionan <i>in vivo</i> con DnaK en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en <i>Psychrobacter frigidicola</i>	117

Indice

Discusión	119
1. Crecimiento de las tres especies de estudio en función de la temperatura.	122
2. Variación en los niveles de expresión de los sistemas de chaperonas GroEL/GroES y DnaK/DnaJ en las especies de estudio en función de la temperatura.	125
3. Mecanismos moleculares de adaptación en <i>Shewanella frigidimarina</i> dependientes de la temperatura.	128
3. 1. Aumento en la expresión de proteínas a bajas temperaturas	128
3. 2. Aumento en la expresión de proteínas a altas temperaturas.....	130
4. Mecanismos moleculares de adaptación en <i>Shewanella oneidensis</i> dependientes de la temperatura.	135
4. 1. Aumento en la expresión de proteínas a bajas temperaturas	135
4. 2. Aumento en la expresión de proteínas a altas temperaturas.....	139
5. Mecanismos moleculares de adaptación en <i>Psychrobacter frigidicola</i> dependientes de la temperatura.	145
5. 1. Aumento en la expresión de proteínas a bajas temperaturas	145
5. 2. Aumento en la expresión de proteínas a altas temperaturas.....	147
6. Visión global de las proteínas que intervienen en la adaptación a la temperatura en <i>S. frigidimarina</i> respecto a <i>S. oneidensis</i> y <i>P. frigidicola</i>	154
7. Reorganización de la maquinaria celular en función de la temperatura.	158
 Conclusiones	 165
 Bibliografía	 169

Abstract

Introduction

The goal of knowing more about the limits of life drives us to aim in the study of extremophiles. Microorganisms known as extremophiles are those able to live and grow under extreme conditions of salinity, radiation, temperature or acidity. Among these factors temperature is one of the most limiting for life because it affects many processes and structures in the cell.

Psychrophiles are extremophiles adapted to live in cold environments. They have to performed strategies to cope with these low temperatures in order to adapt to the environment. These strategies at a molecular level are strongly related with chaperone proteins which lead the quality control of the cell and regulate functions and conformation of other proteins.

Belonging to this superfamily of chaperones, heat shock proteins (Hsp) are the most active and numerous group. And its main members belong to subfamily Hsp70 (DnaK) and to subfamily Hsp60 (GroEL). One of the most important roles of these proteins is the refolding of newly synthesized and denaturalized proteins as well as the response to different types of cellular stress and formation of macromolecular complexes.

In this study, we wanted to elucidate the influence exerted by genome and environment on the adaptation to cold temperature. Thus, we compared the strategies against temperature changes of the psychrotolerant Antarctic bacteria *Shewanella frigidimarina* with those of the mesophilic bacteria *Shewanella oneidensis* and the psychrophilic one *Psychrobacter frigidicola*, also from Antarctica.

Methods

Firstly, we performed diverse experimental approaches from cell cultures of the three named bacteria at different temperatures from 0°C to 30°C. Based on the maximal differences observed in their protein pattern of SDS-PAGE we decided to compare temperatures of 4°C and 30°C for the rest of experimental procedures except for the growth curves in which the growing at the intermediated temperature of 12°C were included. Some optical and electronical microscopy observations were performed from (the) cell cultures.

Once we established cultures of the three bacteria at 4°C and 30°C and after five days of cell incubation, proteins and mRNA were extracted.

Secondly, we performed a relative quantification of gene expression of chaperones GroEL, GroES, DnaK and DnaJ from samples cultured at 4°C and 30°C in both *Shewanellas*.

At last, using the protein extracts of the three bacteria, we performed immunodetection of the main chaperones by western blot, comparisons of whole proteomes by 2D-DIGE, immunoprecipitation of DnaK and GroEL with specific antibodies and their subsequent analysis by 2-DE.

Results

Curves described by the growth at 4°C, 12°C and 30°C are very similar in the three species depending on the temperature but different when temperatures are compared. The growth at 30°C starts before than it does at 4°C, but gets to the stationary phase earlier and reaches lower amount of biomass.

There are not significative differences in the GroEL, GroES, DnaK and DnaJ gene expression between 4°C and 30°C neither in *Shewanella oneidensis* nor in *Shewanella frigidimarina*. But a strong overexpression of these chaperones is observed by immunodetection in samples from 4°C and 30°C cultures of the three bacteria.

There is not significative differences in the GroEL, GroES, DnaK and DnaJ gene expression between 4°C and 30°C neither *Shewanella oneidensis* nor *Shewanella frigidimarina*. But a strong overexpression of these chaperones is observed by immunodetection in samples from 4°C and 30°C cultures of the three bacteria.

Results from 2D-DIGE showed a global overexpression of chaperones and other(s) proteins related to stress response in the growth at 30°C in the three species. The induction of some antioxidant proteins in the growth of *S. frigidimarina* at both temperatures and also in the growth of *S. oneidensis* at 4°C and in *P. frigidicola* at 30°C is detected. A high number of isoforms has been observed at both temperatures in the response of *S. frigidimarina*.

Immunoprecipitation experiments showed higher complexity in the machinery related with GroEL and DnaK at both temperatures in *S. oneidensis* and a tendency to simplification in the two psychrophiles.

Discussion and conclusions

Despite the optimal growing temperature according to the first description, the development at warm temperature seems to be a stressing situation for the three species studied. Further, the increased levels of free radicals and ROS at low temperatures lead to oxidative stress. Both situations induced overexpression of chaperones, stress response proteins and antioxidant proteins, mainly at 30°C in the three bacteria but also at 4°C in the psychrophiles.

The molecular machinery involved in the adaptation at different growth temperatures seems to be quite complex in the mesophilic species, slightly more simple in *S. frigidimarina* and the most simple of three in *P. frigidicola*.

S. oneidensis tends to use macromolecular complexes related to GroEL and DnaK in the development from moderate to low temperatures whereas the opposite occurs in *P. frigidicola*.

S. frigidimarina, which has a preferential post-translational regulation in the temperature adaptation mechanisms, shows higher versatility in the establishment of complexes related with GroEL and DnaK for a wider range of temperatures than the other two bacteria studied.

ABREVIATURAS

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en gel
2-DE	Electroforesis bidimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AFPs	Proteínas anticongelantes (<i>antifreeze proteins</i>)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BVA	Análisis de la variación biológica
Caps	Proteínas de aclimatación al frío
CCB	Azul de coomassie coloidal
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
Ct	Ciclo umbral
DIA	Análisis de diferencias dentro del gel
DO	Densidad optica
DSMZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares
E	Eficiencia de amplificación
ECL	Método de detección por quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HSP	Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
LMW	Bajo peso molecular (<i>Low mollecular weight</i>)
MALDI	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
MODIC	Moderate Resoluting Imaging Spectroradiometer
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NL	No lineal
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDA	Piperazina diacrilamida
pI	Punto isoeléctrico
PMF	Huella peptídica (<i>Peptide Mass Fingerprint</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT-QPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
SC	Secuencia cubierta
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de barrido
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
Tween-20	Monolaurato de polioxietilen-sorbitano
TOF	Tiempo de vuelo

1. Los límites de la vida.

A pesar de la ubicuidad de la vida sobre la superficie terrestre el hecho de ser tan excepcional en el Universo nos lleva a concluir que las condiciones bajo las que la vida persiste en realidad se restringen a un rango muy limitado (Gross, 2001).

Las condiciones ambientales en numerosas áreas de nuestro planeta son extremas desde el punto de vista de los estándares biológicos que conocemos (Gross, 2001) de modo que en muchas de ellas tan sólo los microorganismos, como únicos representantes de vida en estas zonas, pueden sobrevivir y desarrollarse con la ayuda de mecanismos moleculares adaptativos que hacen frente a bajas o altas temperaturas, presión, salinidad, bajo o elevado pH, etc.

Considerando esto y la creciente y frecuente aparición, en el panorama científico, de microorganismos supervivientes a condiciones ambientales extremas R.D. MacElroy propuso, por primera vez, en el año 1974 el término **Extremófilo** para englobar a este tipo de organismos bajo una clasificación artificial que los definía como microorganismos pobladores de ambientes hostiles diferenciándolos de aquellos organismos que sólo crecen en ambientes “intermedios”, es decir, microorganismos mesófilos (MacElroy, 1974). A partir de este primer término se agrupan en otros subtipos los organismos que comparten la adaptación por esos ambientes extremos antes mencionados, así, entre los extremófilos encontramos halófilos, acidófilos, basófilos, termófilos, etc., que soportan altos niveles de salinidad, acidez, basicidad y temperatura, respectivamente.

Pero algo común a todos ellos es que el secreto de la vida subyace al consumo de energía y es dependiente de su flujo (Gross, 2001); esta energía es utilizada por los microorganismos al final de la cadena alimenticia. Y que, además, la disponibilidad de agua líquida es el requerimiento más importante para que se dé la vida. Todos los

Introducción

organismos vivos están constituidos principalmente de agua y la necesitan para sobrevivir (Gross, 2001). Los cambios en sus propiedades fisicoquímicas producidos por diversas condiciones extremas como son las bajas temperaturas afectan directamente a reacciones bioquímicas tales como la absorción de nutrientes de los microorganismos e incrementa la competitividad entre los mismos (Rodrigues y col., 2008).

1. 2. Extremófilos.

El término 'extremófilo' fue acuñado hace más de un cuarto de siglo (MacElroy, 1974), desde entonces ha ido evolucionando hacia un uso que ha llevado a definir bajo esta palabra a aquellos organismos que habitan ambientes poco apropiados para los mamíferos en general (Irwin y col., 2004) derivando en un uso antropocéntrico para designar las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos considerados extremófilos (Chakratvorty y col., 2013). Las condiciones que son "extremas" para unos organismos pueden suponer condiciones esenciales para la supervivencia de otros por ello el concepto de extremofilia es relativo (Irwin y col., 2004).

Los organismos extremófilos abarcan los tres dominios: Bacteria, Arquea y Eucariotas. (Irwin y col., 2004) y su historia evolutiva puede ayudarnos a entender la adaptación a las condiciones y ambientes extremos (Chakratvorty y col., 2013).

Se considera que los extremófilos evolucionaron alrededor de hace un billón de años y fueron descubiertos por primera vez en los manantiales calientes del Parque Nacional de Yellowstone en Estados Unidos (Horikoshi, 2011).

Las investigaciones relativas a los extremófilos han incrementado de manera notable a partir de la publicación del primer genoma secuenciado de una arquea metanogénica, *Methanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996).

Los extremófilos son importantes no sólo porque nos enseñan fundamentos bioquímicos y biodiversidad estructural sino por su enorme potencial como fuentes de

enzimas y otros materiales biológicos con aplicaciones en biotecnología y medicina (Irwin y col., 2004). El descubrimiento de nuevos microorganismos extremófilos y sus enzimas ha tenido un gran impacto en el campo de la biocatálisis, entre otros (Angelaccio, 2013). El término “extremozima” se utiliza para referirse a las enzimas de estos organismos (Hough y col., 1999). Una de estas extremozimas, utilizada casi a diario en laboratorios de diagnóstico e investigación, es la *Taq* ADN polimerasa con un gran impacto por su aplicación en la técnica de PCR debido a que es estable a 95°C (Irwin y col., 2004; Karan, 2012). Fue aislada originalmente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que fue descubierta en las aguas termales del Parque Nacional de Yellowstone (Brock y col., 1969) pero que se encuentra en muchos otros ambientes incluida el agua corriente caliente.

Los organismos psicrófilos son importantes fuentes de enzimas utilizadas para el procesamiento de alimentos a bajas temperaturas e incluso como biosensores (Irwin y col., 2004). Los psicrófilos y sus enzimas, caracterizadas por una elevada actividad catalítica pudiendo funcionar a temperaturas de incluso -20°C, tienen numerosas aplicaciones en industrias como la de alimentación, cosméticos y detergentes y como biosensores ambientales y descubrimiento de nuevas drogas (Garcia-Descalzo y col., 2013). Estas enzimas pueden catalizar numerosas reacciones a temperaturas bajas y moderadas (<40°C) de un modo más eficiente y con menos reacciones químicas no deseadas que pueden ocurrir a altas temperaturas disminuyendo, así, el gasto energético y los costes de procesos que implican pasos de calentamiento (Cavicchioli y col., 2002).

El estudio de los organismos extremófilos ha mejorado la comprensión sobre el plegamiento de proteínas, su estructura y su función. Además, el aumento de investigación en este terreno ha llevado a incrementar los datos filogenéticos con el descubrimiento de nuevos microorganismos y contribuido a conocer el modo en el que

Introducción

los microorganismos responden en el tiempo a nivel molecular ante retos evolutivos que se presentan (Irwin y col., 2004).

2. Un planeta frío.

Considerando que el 90% de los océanos en la Tierra tienen una temperatura igual o inferior a 5°C (Rodrigues y col., 2008), el 70% del planeta está cubierto por mares y océanos que mantienen una temperatura constante de, aproximadamente, 2°C y que el 80% de la biosfera terrestre está permanentemente helada (Russel, 1990), podemos afirmar que habitamos un planeta frío e incluso pensar que aquellos organismos que hacen frente a las bajas temperaturas son los más exitosos colonizadores (Russel, 1990).

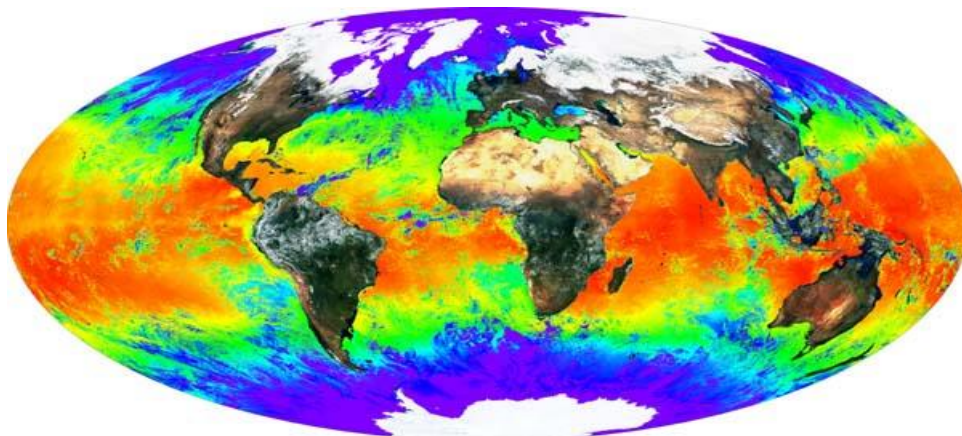


Figura I1. Mapa de temperatura en la superficie terrestre a partir de la combinación de las imágenes MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) de los productos reflectantes de la superficie terrestre y los productos de temperatura de la superficie marina. La escala de color representa un gradiente desde las temperaturas más frías a las más cálidas, desde el morado al naranja respectivamente. Se trata de una composición de datos recogidos durante 20 días sobre continentes y una semana sobre los océanos (de mediados de marzo a principios de abril) ([www.http://modis.gsfc.nasa.gov](http://modis.gsfc.nasa.gov)).

De todas las condiciones naturales que provocan estrés en los seres vivos, el frío es la más frecuente y extendida de todas (Rodrigues y col., 2008). Una temperatura baja ejerce su influencia sobre las propiedades físicas del agua y, de este modo, sobre las reacciones bioquímicas de los organismos, es decir, sobre los procesos físicos y

químicos esenciales para la vida (Rodrigues y col., 2008). En ambientes fríos la temperatura del agua puede disminuir mucho llegando, incluso, a congelarse. Tanto si lo hace como si no las propiedades físicas del agua líquida varían sustancialmente. (Rodrigues y col., 2008).

Los cambios sufridos en las células no son lineales e incluyen: expansión molecular, incremento de viscosidad, disminución de la difusión (Angell, 1982) y formación de un gradiente de iones. Este último efecto es uno de los más influyentes ya que los iones están implicados en la mayoría de las reacciones vitales de los organismos como la condensación, la hidrólisis, procesos de oxidación y reducción (Franks y col. 1990).

Además, la reducción en la capacidad de difusión del agua y su aumento de viscosidad se traduce en una disminución de la tasa de difusión de sustratos lo que dificulta a la célula la adquisición de recursos y nutrientes (Rodrigues y col., 2008).

La disponibilidad de agua limita la supervivencia de los microorganismos que no sean capaces de desarrollar mecanismos moleculares y estrategias de adaptación pero las bajas temperaturas por sí mismas también afectan de manera significativa a parámetros como la actividad enzimática, la fluidez membranal, el transporte de nutrientes, las tasas de transcripción, traducción y división celular, el plegamiento de proteínas e incluso lleva a la formación de hielo intracelular (D'Amico y col., 2006).

A pesar de que la vida en la Tierra se ha adaptado en el transcurso de la evolución a través de billones de años a varias condiciones extremas de sorprendentes maneras, a veces, las leyes de la física han puesto un alto en el camino de la adaptación definiendo un límite absoluto tras el que la vida no puede existir (Gross, 2001). En este límite juega un papel crucial la temperatura, probablemente el factor más limitante de todos que también afecta a la conformación de las macromoléculas en la célula (Russel, 1990).

2. 1. Psicrófilos: Vida a bajas temperaturas.

Desde que, en 1902, Schmidt-Nielsen describiera por primera vez una bacteria capaz de crecer y sobrevivir a 0°C (Schmidt-Nielsen, 1902; Russell, 1992) la comunidad científica ha mantenido durante años un debate abierto (especialmente en los años 60) sobre el uso más o menos adecuado del término psicrófilo que experimentó épocas de confusión con otros términos cercanos como psicrotolerante o psicrótrofo. Por este motivo y con el objetivo de esclarecer la situación a la que se había llegado y eliminar futuras confusiones Richard Y. Morita publicó una revisión en el año 1975 (Morita, 1975) en la que proponía la definición de psicrófilo como aquel organismo con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 15°C o menor, una máxima temperatura de crecimiento alrededor de los 20°C y una mínima temperatura de crecimiento a 0°C o por debajo. Señalando, además, que las temperaturas cardinales dadas coincidían con aquellas aparecidas en el Diccionario de Microbiología del año 1957 (Morita, 1975). En esta línea, los microorganismos psicrotolerantes o psicrótrofos se definen como aquellos que mantienen la capacidad de crecer a 0°C pero sobre todo cercanos a este punto (3°C-5°C) con un óptimo de temperatura de crecimiento por encima de los 15°C, normalmente alrededor de los 20°C, y con el límite superior por encima de los 20°C, en algunos casos hasta los 40°C (Barros y col. 1978. Russell, 1990). Aunque la distinción clara entre psicrófilos y psicrotolerantes se estableció de manera más contundente a partir de un trabajo publicado por Russel en 1993 basado en diferencias bioquímicas (Russell, 1993).

Los psicrófilos suelen encontrarse en ambientes permanentemente fríos (Russel, 1992), donde a menudo son el tipo dominante (Wynn-Williams, 1990), y, principalmente en ambientes acuáticos donde la temperatura es más estable (Russel, 1990). Tienen rangos más estrechos de temperatura en los que se pueda dar el crecimiento que los psicrótrofos o psicrotolerantes. Estos son característicos de

hábitats fríos en los que la temperatura fluctúa tanto a lo largo del día como durante el año siendo, por ello, organismos más adaptables o de mayor versatilidad que encuentran en estos ambientes ventajas como la adaptabilidad nutricional (Russell y col., 1998); su rango de temperatura de crecimiento es más amplio.

Sin embargo, otros autores como D'Amico y colaboradores engloban en el término psicrófilo a todos aquellos microorganismos con la habilidad de crecer bien a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua. Esta capacidad implica el éxito de estos organismos frente al reto de la baja temperatura que afecta exponencialmente a la tasa de las reacciones bioquímicas y a la viscosidad de los ambientes acuosos, la cual se duplica a lo largo del rango que va de 37°C hasta los 0°C (D'Amico y col., 2006). A temperaturas cercanas a -20°C, se han encontrado bacterias en el hielo marino y en el permafrost que mantienen actividad metabólica gracias a la existencia de una pequeña cantidad de agua sin congelar en el interior del permafrost o del hielo con una alta concentración en sales (D'Amico y col., 2006).

2. 1. 1. Adaptación de los psicrófilos a su hábitat frío.

La fisiología y bioquímica de la célula se modifican por acción de la temperatura para poder proliferar y hacer frente a las alteraciones que ésta provoca. El frío es un estrés que varía los parámetros físico-químicos de la célula alterando las tasas de difusión de solutos, transporte de nutrientes e intercambio de productos, la cinética de las enzimas reduciendo su actividad, la conformación y fluidez de la membrana que disminuye, la flexibilidad, topología e interacciones de macromoléculas como el ADN, el ARN y las proteínas, provocando su desnaturalización y el incorrecto plegamiento, así como la maquinaria transcripcional reduciendo, también, la traducción y la división celular (Russel, 1990; D'Amico y col., 2006; Rodrigues y col., 2008; Schumann, 2009; Alcazar y col., 2010).

Introducción

La composición lipídica de la membrana es la responsable de mantener adecuadamente su fluidez y estructura para que las proteínas membranales puedan llevar a cabo el transporte e intercambio de iones, nutrientes y electrones de manera correcta (Russell, 1992). Cuando la temperatura es muy baja los microorganismos regulan su composición lipídica, dentro de unos límites, para mantener las funciones de estas proteínas (Russel, 1992; Russell y col., 1998). Así, se incrementa el contenido de lípidos insaturados y poliinsaturados, también las metilaciones, y se disminuye la longitud de las cadenas acilo (Russel, 1992; D'Amico y col., 2006) para reducir el contacto entre cadenas adyacentes (Feller, 2007). Otras moléculas asociadas a la membrana pueden jugar un papel importante en la adaptación a bajas temperaturas como son los pigmentos carotenoides, muy presentes en las bacterias psicrótrofas de la Antártida, que incrementan la rigidez de la bicapa lipídica (Rodrigues y col., 2008).

La transcripción y la traducción también son procesos que se ven alterados por un ambiente frío y que los microorganismos deben modular para encontrar la manera de que la maquinaria funcione correctamente. La reducción en la actividad enzimática de la transcripción y la traducción lleva a una desestabilización de la estructura secundaria de las moléculas de ADN y ARN y, en última instancia, a la incorrecta síntesis de proteínas que, además y por efecto de la temperatura, no se pliegan adecuadamente y pueden formar agregados dañinos para la célula (D'Amico y col., 2006). Para hacer frente a esta situación los psicrófilos han desarrollado, entre otras estrategias, la capacidad de sintetizar enzimas adaptadas al frío (Siddiqui y col., 2006).

Una estrategia para mantener la actividad de la célula en ambientes con baja temperatura permanente es la de producir enzimas adaptadas al frío con una alta eficiencia catalítica (Georlette y col., 2004) y con otras características que aunque no siempre se relacionan con este tipo de adaptación (Siddiqui y col., 2006) nos permite,

a grandes rasgos, englobar a un grupo de enzimas presentes en los psicrófilos que les posibilitan la supervivencia en ambientes fríos.

Así como la estabilidad y la rigidez están estrechamente ligadas a las proteínas termoestables de especies mesófilas es de esperar que todo lo contrario ocurra en las psicrófilas (Russel, 2000).

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel esencial y central en la estabilidad de las proteínas independientemente del rango de temperatura al que son activas (Franks, 1995). Los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas son fuertes a bajas temperaturas, porque su formación es exotérmica mientras que las uniones hidrofóbicas, formadas endotérmicamente, son más débiles en estas condiciones (Russel, 2000). Los organismos psicrófilos hacen frente a la pérdida de flexibilidad de las enzimas mediante cambios en los enlaces intramoleculares, en las interacciones con los solutos y entre subunidades, mediante compactación y por aumento de residuos polares en detrimento de los hidrofóbicos, incluso, entre subunidades (Russel, 2000). La hipótesis más aceptada para explicar la adaptación de estas enzimas es la que relaciona actividad-estabilidad-flexibilidad (Johns y col., 2004) Sugiere una modulación de la flexibilidad mediante la reducción de la hidrofobicidad bien en toda la proteína o restringida a aquellas partes implicadas en la catálisis (D'Amico y col. 2006). Algunos de los ejemplos mejor conocidos de este tipo de enzimas son: lactato deshidrogenasa, citrato sintasa, α -amilasa y malato deshidrogenasa (Russel, 2000).

Otra estrategia propia de los psicrófilos con la que hacen frente a las bajas temperaturas para adaptarse es la síntesis de proteínas anticongelantes (AFPs por sus siglas en inglés *antifreeze proteins*) que poseen la habilidad de unirse a los cristales de hielo y disminuir la temperatura a la que el organismo puede vivir.

Introducción

También, moléculas como la trehalosa y los exopolisacáridos tiene un papel importante en la crioprotección previniendo la desnaturalización y agregación de proteínas (D'Amico y col., 2006).

Las bajas temperaturas influyen también en la estabilidad de las macromoléculas, especialmente de proteínas y ácidos nucleicos. Las primeras la pierden por desnaturalización que reduce las interacciones hidrofóbicas de la cadena. Para los ácidos nucleicos el problema parece ser justo el contrario, la molécula alcanza demasiada estabilidad ya que a bajas temperaturas las uniones de los pares de bases nitrogenadas se fortalecen provocando la aparición de estructuras secundarias anormales por ensamblajes inadecuados que imposibilitan el correcto funcionamiento (Hochachka y col., 2002).

La pérdida de conformación de las proteínas en los psicrófilos (Feller, 2007), su incorrecto plegamiento y la formación de agregados insolubles a partir de estas proteínas mal plegadas suponen un problema importante, no sólo, y como más tradicionalmente se conoce, en los ambientes a altas temperaturas sino que son procesos que también se dan a bajas temperaturas (Phadtare, 2004). La débil estabilidad de su estructura, de su sitio activo y de la unión por el ligando o sustrato está relacionada con el factor entrópico, con el “desorden” y las macromoléculas requieren de una apropiada conformación dinámica para poder ejercer sus funciones biológicas adecuadamente (Feller, 2007).

2. 1. 2. Psicrófilos vs. Mesófilos.

La vida que conocemos existe dentro de un amplio margen de temperatura que va desde los -15°C a los 122°C (D'Amico y col., 2006). En general, los microorganismos se clasifican atendiendo a este parámetro en psicrófilos, mesófilos y termófilos (De Lorenzo, 2010), basándose en las temperaturas cardinales mínima, óptima y máxima de crecimiento y replicación (Lamanna y col., 1973) y es en las temperaturas moderadamente cálidas donde encontramos a los mesófilos entre valores de 20°C y 45°C (Metpally y col., 2009).

Una de las principales diferencias que existen entre mesófilos y psicrófilos son las proteínas de aclimatación al frío (Caps) que están presentes de manera mucho más generalizada en los psicrófilos que en los mesófilos, constituyendo una de las claves de la adaptación al frío (Hébraud y col., 1999). Estas proteínas de aclimatación al frío son sintetizadas de manera continua durante un prolongado crecimiento a bajas temperaturas, a diferencia de las proteínas de choque por frío (Csp) que son inducidas tras un estrés térmico o brusca bajada de temperatura (Panoff y col., 1997). Se sabe que el representante mesófilo más ampliamente estudiado, *Escherichia coli*, posee una respuesta adaptativa frente a una bajada de temperatura por la que la mayoría de los procesos de traducción y transcripción de la célula disminuyen mucho hasta casi detenerse. Mientras que un set de proteínas de choque por frío son expresadas de manera temporal, como la proteína mayor de choque térmico (CspA), pero ninguna es inducida de novo (Gualerzi y col., 2003).

Muchos estudios en la última década comparan la adaptación estructural de las enzimas y la naturaleza de sus residuos de aminoácidos entre mesófilos y termófilos (Lin, 2008) y, más recientemente, algunos entre psicrófilos y mesófilos (Metpally y col., 2009; Paredes y col., 2011).

Introducción

Así, otra diferencia importante entre mesófilos y psicrófilos hace referencia a la presencia y abundancia de ciertos aminoácidos en la composición de sus proteínas (Metpally y col., 2009). En general, se sabe que la naturaleza de las proteínas termoestables radica sobre todo en la composición y orden de las cadenas de aminoácidos (Lin, 2008) y que, evolutivamente, la adaptación a los cambios de temperatura ha implicado continuos y pequeños ajustes de parámetros relacionados con la composición de aminoácidos para determinar la estabilidad y actividad de las proteínas y su mayor o menor flexibilidad (Vendittis y col., 2007) especialmente de las enzimas.

3. Principales características de los géneros *Shewanella* y *Psychrobacter*.

3. 1. El género *Shewanella*.

El género *Shewanella* engloba a un elevado número de bacterias marinas y de agua dulce (Dikow, 2011), así como de diferentes ambientes sedimentarios a lo largo de la Tierra (Rodionov y col., 2011). Son Gram negativas pertenecientes a la familia de las gamma-proteobacterias (Dikow, 2011, Rodionov y col., 2011).

Sus hábitats descritos versan desde las profundidades marinas más frías hasta las aguas poco profundas del océano Antártico pasando por chimeneas hidrotermales y lagos de agua dulce (Dikow, 2011). Este género ha demostrado tener diversas capacidades metabólicas y de adaptación para sobrevivir en condiciones extremas (Hau y col., 2007).

Aunque algunos miembros de este género, como *Achromobacter putrefaciens* (actualmente *Shewanella putrefaciens*) fueron identificados ya en 1931 el género *Shewanella* no fue reconocido como tal hasta el año 1985 (MacDonell y col., 1985).

Se trata de un género cuyos representantes son anaeróbicos facultativos siendo una de sus principales características la gran versatilidad para utilizar una amplia variedad de aceptores terminales de electrones para realizar esta respiración anaerobia (Fredrickson y col., 2008, Rodionov y col., 2011). Esta característica les confiere gran interés debido a que pueden convertir metales pesados y sustancias tóxicas como el hierro, el sulfuro y el uranio, por ejemplo, en productos menos tóxicos utilizándolos como aceptores de electrones (Dikow, 2011). Diversos miembros de este género han sido considerados como los responsables de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y sulfuro en los intercambios redox de los ambientes marinos (Rodrigues, 2011).

3.2. El género *Psychrobacter*.

El género *Psychrobacter* engloba a bacterias Gram negativas cocobacilares, aeróbicas estrictas, sin movilidad, quimioheterótrofas, adaptadas al frío y osmotolerantes (Bowman, 2006). Este grupo comprende bacterias psicrófilas, psicrotolerantes, halotolerantes que han sido aisladas de muy diversos ambientes como sedimentos, suelo ornitogénico ártico y antártico, krill antártico (Dziewit y col., 2013) de ecosistemas altamente salinos, de carne y pescado congelados, permafrost ártico, heces de pingüinos, profundidades marinas, hielo antártico, (Bakermans y col., 2006; Bowman, 2006).

Fue descrito por primera vez como un género propio separándose de *Acinetobacter* en 1986 por Juni y Heym (Bowman, 2006). Este género pertenece a la familia *Moraxellaceae* (Rossau y col., 1991; Enright y col., 1994) que forma una rama propia en la clase Gammaproteobacteria (Garrity y col., 2001).

Las especies de *Psychrobacter* son capaces de reproducirse en un rango de temperatura amplio desde los -10°C a los 37°C (Bakermans, 2006) aunque algunos trabajos han establecido este rango entre -10°C y 42°C (Su Jin Kim y col., 2012).

Introducción

Muchos miembros de este género son endémicos de ambientes extremadamente fríos y salinos pero su presencia no se restringe a este tipo de ambientes, donde sí tienen mayor éxito, pueden encontrarse, aunque mínimamente, en ambientes templados y tropicales (Azevedo y col., 2013).

A partir de estudios medioambientales combinados con la secuenciación del gen del ARN ribosomal del 16S queda de manifiesto que el género *Psychrobacter* está ampliamente distribuido y que forma un grupo de bacterias evolutivamente exitoso cuya biología puede darnos un importante conocimiento sobre temas como la adaptación y la supervivencia (Bowman, 2006; Su Jin Kim y col., 2012).

4. Especies bacterianas estudiadas. Descripción y caracterización.



Figura I2. Lugares de procedencia de las especies estudiadas. (A) *Shewanella oneidensis*, aislada del Lago Oneida (estado Nueva York, USA); (B) *Shewanella frigidimarina*, aislada del hielo antártico marino. (Vestfold Hills in Eastern Antarctica (68° S 78° E); (C) *Psychrobacter frigidicola*, aislada de suelos antárticos. Eastern Antarctica (Vestfold Hills). Cada fotografía incluye una imagen de las células de cada especie tomada con el microscopio de contraste de fases.

En este estudio se comparan tres especies bacterianas (Figura I2), dos de ellas pertenecientes al género *Shewanella* pero procedentes de ambientes diferentes desde el punto de vista de la temperatura pero que compartirán un alto porcentaje de su genoma (Figura I3.); son *Shewanella oneidensis*, especie mesófila inicialmente aislada del lago Oneida (figura I2. A) y *Shewanella frigidimarina*, psicrófila, encontrada por primera vez en la Antártida (figura I2. B). A su vez, se compara esta última con otra especie de distinto género, *Psychrobacter frigidicola*, pero procedente también de la Antártida (figura I2.C). De esta forma se pretende comparar los factores ambientales y genéticos.

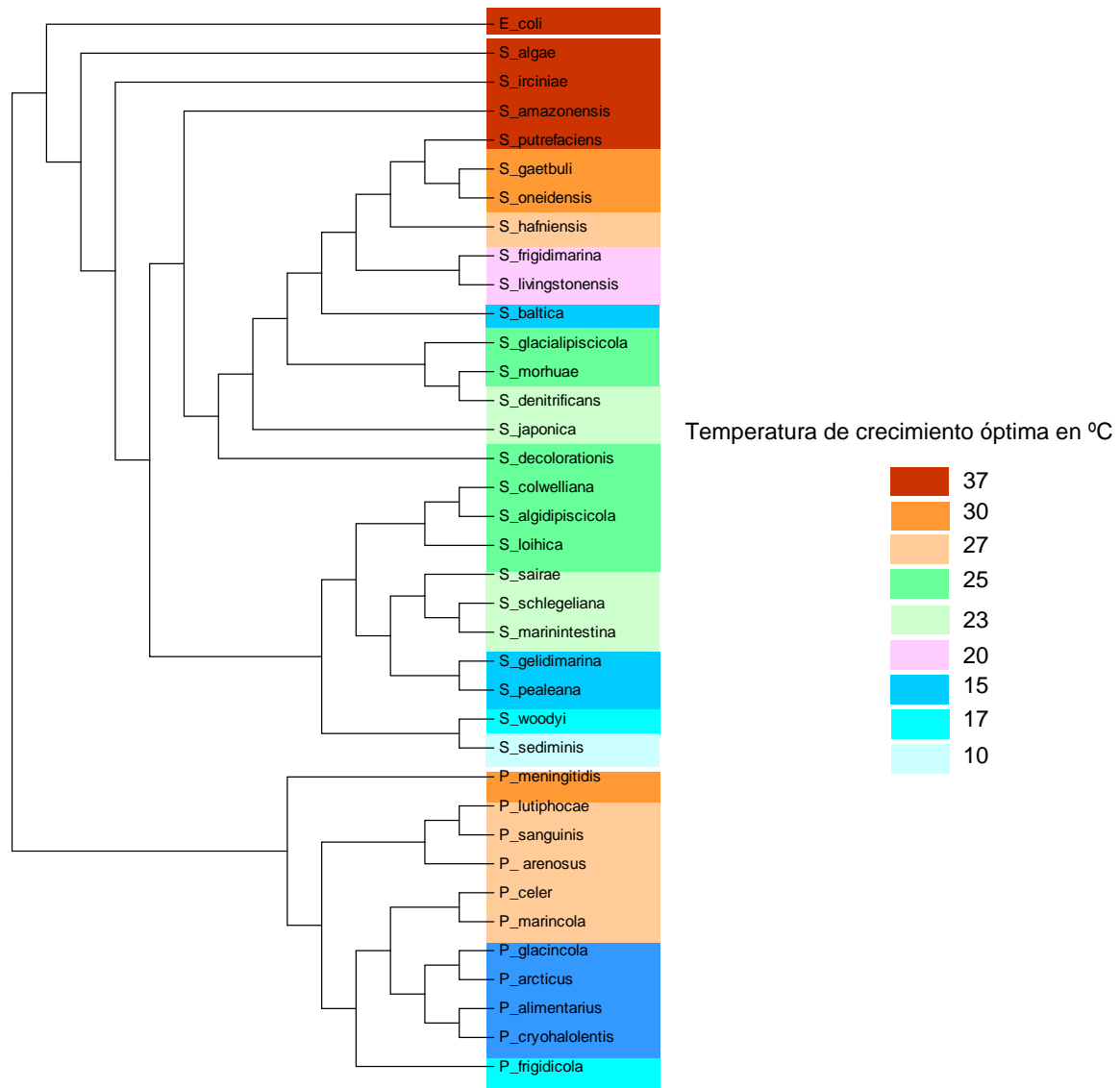


Figura I3. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de ARNr 16S a partir de cepas de los géneros *Shewanella* y *Psychrobacter*. El análisis se llevó a cabo mediante el método Neighbour Join (NJ) usando el programa MEGA 5. Los colores hacen referencia a la temperatura óptima de crecimiento de cada especie según se detalla en la leyenda y a partir de la base de datos de *Shewanella* (J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Shewanella*) y de la revista IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) para *Psychrobacter*.

4. 1. *Shewanella oneidensis*.

Su nombre proviene del lugar del que fue aislada: Lago Oneida, en New York (Estados Unidos).

Taxonomía:

- Filo: Proteobacteria
- Clase: γ -Proteobacteria
- Orden: *Alteromonadae*
- Familia: *Shewanellaceae*
- Género: *Shewanella*
- Especie: *Shewanella oneidensis*

En el año 1988 Myers y Nealson demostraron la producción de energía y el crecimiento acoplado a la reducción del hierro y de óxidos de manganeso en la especie denominada *Shewanella* sp. MR-1 ('metal-reducing') (Myers y col., 1988). Esta cepa MR-1 fue, entonces, identificada como *Shewanella putrefaciens*.

En un trabajo publicado en el año 1999 por Katsthuri Venkateswaran y colaboradores se realiza una reorganización del género *Shewanella* mediante el empleo de la reasociación ADN-ADN, sondas moleculares, perfiles de ácidos grasos y quinonas y tests fisiológicos clásicos, llegando a la reasignación de la cepa *Shewanella putrefaciens* MR-1 como *Shewanella oneidensis* MR-1 (Venkateswaran y col., 1999).

La cepa tipo posee una morfología bacilar con un tamaño aproximado de entre 2 y 3 μ m de longitud y 0,5-0,6 μ m de diámetro. Se trata de una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa con flagelo polar. No forma ni endosporas ni cápsulas. Las colonias que aparecen cuando se cultiva en LB-agar son circulares, lisas y convexas y coloración desde beige a ligeramente rosadas (Venkateswaran y col., 1999).

Introducción

No requiere de sodio para su crecimiento, a temperaturas mesófilas, situándose su óptimo de crecimiento en 30°C. Posee la capacidad de reducir nitrato a nitrito así como de oxidar nitrito a nitrato. Muestra actividad citocromo oxidasa, catalasa y gelatinasa y produce H₂S a partir de tiosulfato (Venkateswaran y col., 1999).

No hemoliza eritrocitos y muestra un débil crecimiento a una concentración de NaCl de aproximadamente un 3%. Utiliza lactato, succinato y fumarato como única fuente de carbono, reduce los óxidos de metales de transición (Fe, Mn, U) y el sulfuro elemental (Venkateswaran y col., 1999).

4. 2. *Shewanella frigidimarina*.

Esta especie fue aislada del hielo marino antártico y descrita por primera vez en el año 1997 en un trabajo de John P. Bowman y colaboradores (Bowman y col., 1997).

Taxonomía:

- Filo: Proteobacteria
- Clase: γ-Proteobacteria
- Orden: *Alteromonadae*
- Familia: *Shewanellaceae*
- Género: *Shewanella*
- Especie: *Shewanella frigidimarina*.

La morfología de esta bacteria es bacilar tanto con aspecto curvado como recto. Posee una longitud de entre 1 y 2,5µm y un diámetro de entre 0,5 y 0,8µm, y puede agruparse en parejas. Es móvil. Químico heterótrofo anaerobio facultativo.

El crecimiento en anaerobiosis se produce por fermentación de la D-glucosa o alternativamente mediante respiración anaeróbica de componentes férricos, nitrato o TMAO como aceptor de electrones y lactato sódico y acetato sódico como donadores de electrones (Bowman y col., 1997).

Se trata de una bacteria psicrótrofa que puede crecer desde temperaturas inferiores a 0°C hasta 27-28°C, siendo la temperatura óptima entre 20°C y 22°C. No es halófila pero tolera hasta un 9% de NaCl. No requiere factores de crecimiento. Utiliza fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas. Catalasa y oxidasa positiva. Proteolíticas y lipolíticas. Pueden hidrolizar la esculina y producir sulfuro de hidrógeno a partir de tiosulfato. Pocas cepas muestran reacciones positivas débiles para el ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido), la arginina dihidrolasa y la ornitina descarboxilasa. No produce amilasa ni quitinasa. Forma ácido por oxidación de celobiosa, D-glucosa, maltosa, D-manitol y sacarosa. También a partir de D-galactosa, D-manosa, trehalosa y D-xilosa. Todas las cepas utilizan las siguientes fuentes de carbono: celobiosa, D-glucosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, D-manitol, acetato, butirato, propionato, isobutirato, valerato, succinato, fumarato, DL-lactato, L-malato, piruvato, oxalacetato y L-leucina. También pueden utilizar D-fructosa, D-galactosa, D-xilosa, caproato, nonanoato, L-glutamato, L-fenilalanina, hidroxil-L-proline, L-prolina, y γ-aminobutirato (Bowman y col., 1997).

Las cepas encontradas de esta especie se aislaron del hielo marino, de la biomasa de algas del hielo marino, de cianobacterias y de los Lagos *Ace* y *Burton* de la Antártida. La cepa tipo se denomina ACAM 591 y fue aislada del hielo marino antártico (Bowman y col., 1997).

4. 3. *Psychrobacter frigidicola*.

Se trata de una bacteria cocoide con un diámetro de entre 1,5 y 2µm que se observa sobre todo en parejas o tétradas y raramente aparecen formando pequeñas cadenas. Fue descrita por Bowman en el año 1996 (Bowman y col., 1996).

Introducción

Taxonomía:

- Filo: Proteobacteria
- Clase: γ -Proteobacteria
- Orden: *Pseudomonadae*
- Familia: *Moraxellaceae*
- Género: *Psychrobacter*
- Especie: *Psychrobacter frigidicola*

Aeróbica estricta, no móvil, con metabolismo puramente oxidativo. Su crecimiento es inhibido por una concentración del 1% en sales biliares. Ligeramente halófila, el óptimo de crecimiento se produce a una concentración de 0,25-0,30M de NaCl (capaz de crecer en ausencia de NaCl y puede tolerar un 9% de concentración) (Bowman y col., 1996).

Es psicrófila situando su crecimiento óptimo a una temperatura de entre 15°C y 18°C. Los máximos y mínimos teóricos de temperatura descritos por primera vez para su crecimiento se sitúan en 14°C-16°C y -18°C (Bowman y col., 1996).

Utiliza los siguientes compuestos como única fuente de carbono y energía: acetato, butirato, valerato, caproato, suberato, azelato, fumarato, glioxilato, L-malato, L-asparagina, L-glutamato, L-fenilalanina, L-prolina, alantoína, ácido úrico, y sarcosina. También pueden utilizar glutarato y γ -aminobutirato. La cepa tipo ACAM 304, fue aislada del suelo ornitogénico de la Antártida.

Produce fenilalanina arilamidasa. Las pruebas para ureasa, reducción del nitrato, citrato de Simmons, fosfatasa, esterasa C4, esterasa C14, arilamidasa glicina, arilamidasa leucil glicina y serina arilamidasa son negativas. Tampoco produce lipasas. No forma ácido a partir de carbohidratos. Puede producir arginina y arilamidasa tirosina e hidrolizar xantina. (Bowman y col., 1996).

5. Proteínas de adaptación. Chaperonas.

Mediante el estudio de las adaptaciones moleculares de los microorganismos que son capaces de sobrevivir y desarrollarse en condiciones antropocéntricamente extremas, se puede intentar identificar los componentes celulares que limitan la vida (Alcázar y col., 2010).

Las chaperonas son proteínas constitutivas encargadas de que el plegamiento y la conformación de otras proteínas sean correctos y de eliminar aquellas que no se han plegado bien durante el proceso de síntesis o por efecto de una situación de estrés celular. Por tanto, suponen componentes esenciales del control de calidad de la maquinaria celular (Hartl y col., 2002). Junto con sus cofactores asociados forman un grupo de proteínas altamente especializado en dirigir este plegamiento y desplegamiento de otras proteínas así como el ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos (Cloutier y col. 2013). Como principio elemental se sabe que la información requerida para que la proteína adopte la conformación tridimensional correcta está en su secuencia de aminoácidos (Cooper y col., 2000; Beckerman, 2005).

Las chaperonas fueron originalmente identificadas como proteínas inducibles involucradas en la protección de las células frente al estrés y hoy se sabe que participan en un amplio rango de funciones debido a su capacidad para unirse selectivamente a los residuos hidrofóbicos de las proteínas diana (Hendrick y col., 1993).

Estas proteínas median en el plegamiento de otras proteínas, especialmente en el de aquellos polipéptidos más grandes y complejos implicados en la señalización celular; pliegan la cadena polipeptídica nascente de una nueva proteína que está siendo sintetizada en los ribosomas; estabilizan otras proteínas en su conformación

Introducción

desplegada participando en su translocación a través de las membranas intracelulares; previenen la agregación de proteínas mal formadas mediante su degradación y estabilizan el replegamiento de las que han sido parcialmente desnaturalizadas como resultado de la exposición a una situación de estrés ambiental (Cooper y col., 2000; Hochachka y col., 2002; Beckerman, 2005, Cloutier y col., 2013). Se sabe que en la biogénesis de las proteínas de la membrana bacteriana externa están implicadas una serie de chaperonas moleculares y complejos de proteínas para el transporte, la estabilización y la inserción en la membrana (Björn, 2012). Otros trabajos también resaltan la importancia de las chaperonas en la translocación de proteínas a través de la membrana, en la estabilización de las interacciones proteína-proteína y en la biogénesis ribosomal (Bogumil y col., 2012).

Entre la multitud de funciones mencionadas que desempeñan las chaperonas su habilidad para mediar en el ensamblaje de complejos oligoméricos es de elevado interés. Los avances en proteómica funcional han revelado esta importancia al sugerir que gran parte del proteoma de una célula realiza su función preferiblemente a través de complejos multiproteicos y no en entidades únicas, individualizadas. (Bromfield y col., 2013). Otros trabajos recientes también señalan el papel central que ocupan las chaperonas en el ensamblaje de estos complejos debido a su capacidad en asistir al correcto plegamiento de las proteínas con las que interaccionan y mitigando, a su vez, el riesgo de la aparición de interacciones inespecíficas que llevan a la formación de agregados aberrantes (Boulon y col., 2008; Boulon y col., 2010; Iki y col., 2010; Iwasaki y col., 2010).

Además de las chaperonas más generales implicadas en el plegamiento de otras proteínas existen varias chaperonas especializadas e independientes de ATP con una implicación en varias vías de secreción de manera que se ha propuesto que la señal de secreción en algunas bacterias reside, entre otros, en la unión de la chaperona a su efector (Parsot y col., 2003). En este mismo trabajo se destacan otros papeles de las

chaperonas como son la translocación, la regulación transcripcional, probablemente de manera indirecta, y su implicación en el sistema flagelar a través de sustratos como las proteínas asociadas al soporte del aparato flagelar FlgL y FlgK (Parsot y col., 2003).

5. 1. Proteínas de choque térmico (Hsp).

Entre otras familias de chaperonas, las *heat-shock proteins* (Hsp) desempeñan un papel bien conocido y documentado en la prevención de agregados aberrantes de proteínas además de facilitar la síntesis de éstas, la translocación, el plegamiento *de novo* y de mediar en el ensamblaje de complejos multiproteicos (Bromfield y col., 2013). Su presencia aumenta en la célula cuando aparecen determinadas situaciones de estrés como cambios en la temperatura del ambiente en el que se desarrollan las células. Otra familia más recientemente estudiada que aumenta su presencia en la célula ante situaciones en las que se experimenta una bajada de la temperatura, son las *cold-shock proteins* (Csp) (D'Amico y col., 2006). A diferencia de las Hsps que han sido intensamente descritas tanto en procariotas como en eucariotas las Csps no se han encontrado en eucariotas (Hochachka y col., 2002). No hay que olvidar que la respuesta al choque térmico por frío no sólo se produce en las especies psicrófilas sino, también, en mesófilas e incluso en termófilas (Russell y col., 1998). La exposición de las células a un estrés por baja temperatura también puede inducir algunas Hsps (Hochachka y col., 2002, García-Descalzo y col., 2011).

Las principales familias de Hsps están altamente conservadas y divididas o clasificadas en relación a su secuencia y en base a su peso molecular (Makhnevych y col., 2013). Son destacables dos grandes familias especialmente importantes, las Hsp70 y las Hsp60 (Figura I4) (Cooper y col., 2000; Beckerman, 2005).

Las primeras estabilizan las cadenas de polipéptidos durante la traducción en el nacimiento de una nueva proteína y durante el transporte de los polipéptidos a los compartimentos subcelulares manteniendo la conformación desplegada para que

Introducción

puedan atravesar las membranas pero impidiendo la formación de agregados (Cooper y col., 2000). De este modo participan en la señalización celular (Beckerman M., 2005). A este grupo pertenece la chaperona **DnaK** de las bacterias que actúa de la mano de otra co-chaperona que regula su actividad, en este caso la denominada **DnaJ** perteneciente al grupo de las Hsp40 (Beckerman, 2005).

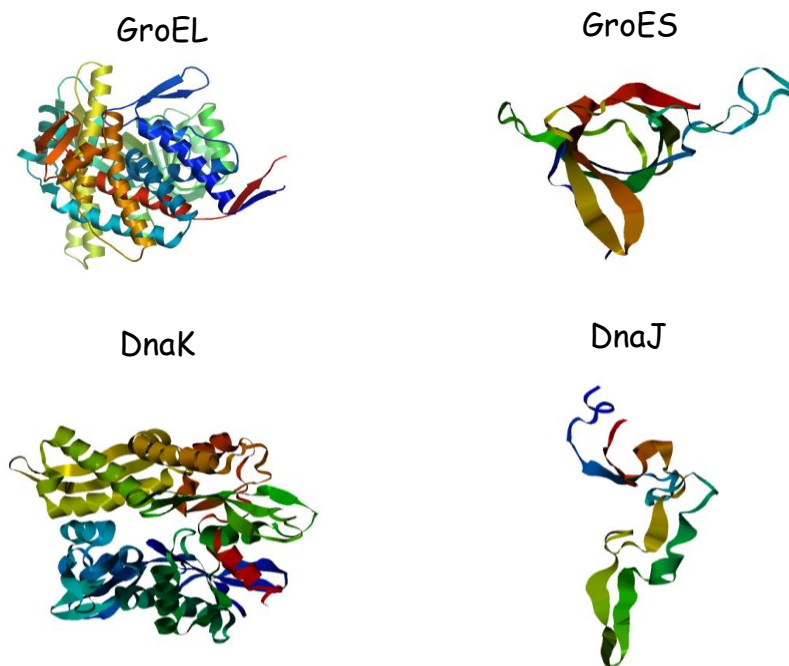


Figura I4. Modelos tipo lazo de las estructuras cuaternarias de las principales chaperonas de las familias Hsp70 (DnaK), Hsp40 (DnaJ), Hsp60 (GroEL) y Hsp10 (GroES) utilizando el recurso informático Swiss-model repository (Kiefer, 2009) y la base de datos ExPASy (Gasteiger, 2001).

La familia de las Hsp60 también se conoce con el nombre de chaperoninas y facilitan el plegamiento de las proteínas hacia su conformación nativa ante una situación de estrés. Cada una de ellas está compuesta por 14 subunidades distribuidas en dos anillos idénticos que forman un cilindro en cuyo centro se lleva a cabo el plegamiento de los polipéptidos. Primero se unen a la proteína sustrato y después proporcionan la energía necesaria a través de la hidrólisis del ATP para que, gradualmente, se obtenga la conformación correcta (Cooper y col., 2000). Junto con esta familia de Hsps, a la que pertenece la chaperonina **GroEL** bacteriana, actúa otro grupo que asiste en el plegamiento mediante la unión al cilindro anterior como si de una tapa se

tratara. La co-chaperonina **GroES**, que ejerce su actividad junto con GroEL, pertenece a este grupo conocido como familia Hsp10 (Beckerman, 2005).

En ocasiones los miembros de las familias Hsp70 y Hsp60 actúan en conjunto (Figura I5) en una acción secuencial, por ejemplo, durante el transporte de proteínas y durante el plegamiento de otras de nueva síntesis (Langer y col., 1992; Cooper y col., 2000).

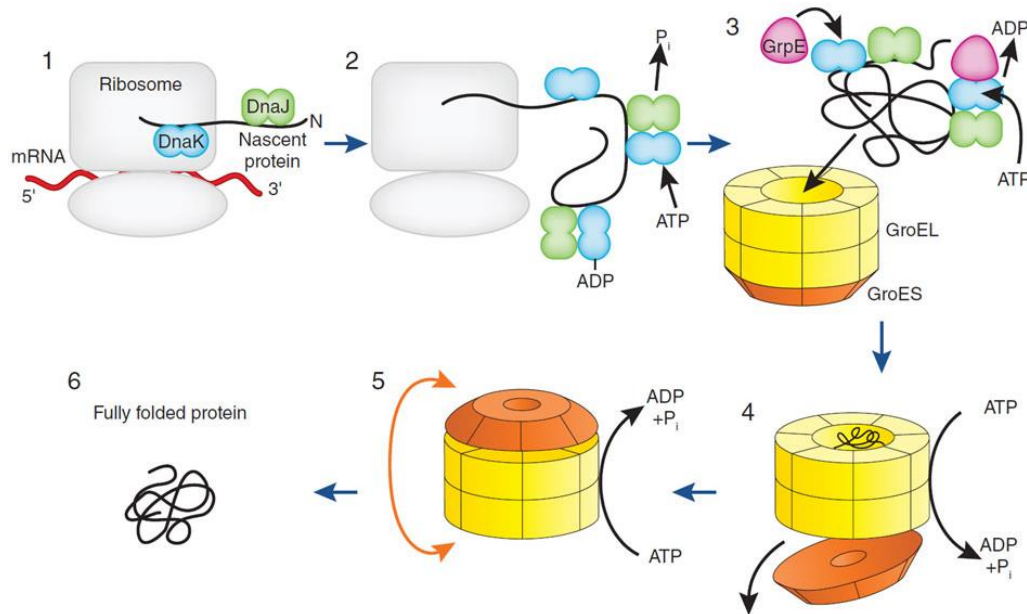


Figura I5. Modelo de la vía de plegamiento de proteínas asistido por chaperonas en el que se ve la cooperación secuencial de los principales sistemas de chaperonas Hsp70 y Hsp60 y el cambio conformacional de estas chaperonas dependiente de ATP.

En las eubacterias el plegamiento de las proteínas en el citosol está coordinado por tres sistemas de chaperonas: (1) *Trigger Factor* (TF), (2) DnaK y sus cofactores DnaJ y GrpE y (3) GroEL junto a su cofactor GroES (Robin y col., 2009).

Los niveles de Csps también se incrementan en la célula cuando hay una situación de estrés por bajada de temperatura; estas proteínas están implicadas en varios procesos celulares como transcripción, traducción, plegamiento de proteínas y regulación de la fluidez membranal (Phadtare, 2004). La representante más conocida de este grupo es una proteína de unión a ácidos nucleicos que supone un regulador transcripcional de otras Csps: CspA (Russell y col., 1998). Es necesario señalar las diferencias entre

Introducción

estas Csps y las proteínas de adaptación o aclimatación al frío, *cold-acclimation proteins* (Caps) ambas presentes en los psicrófilos, pero con la particularidad de que muchas de las Csps observadas en los mesófilos actúan como Caps en los organismos psicrófilos, donde se expresan constitutivamente a bajas temperaturas y no de manera transitoria como ocurre en los mesófilos (D'Amico y col., 2006; Russell y col., 1998).

La respuesta de una bacteria al estrés producido por bajas temperaturas sigue dos caminos. Puede tratarse de un *shock* cuando se transfiere a una bacteria desde su temperatura óptima a otra más baja pero permisiva para el crecimiento, originándose una respuesta adaptativa rápida y transitoria. Las Csps se sintetizan como respuesta a este tipo de estrés. O se puede dar una aclimatación si la transferencia de la bacteria es duradera, apareciendo una respuesta más tardía y continuada que va acompañada de síntesis de Caps; éstas son, entonces, específicamente sintetizadas durante el crecimiento continuo a bajas temperaturas (Panoff y col., 1997).

Además de las chaperonas, y en relación al plegamiento de proteínas, las células poseen, al menos, dos tipos de enzimas que también catalizan el plegamiento proteico mediante la rotura y nueva formación de uniones covalentes. Son la proteína disulfuro isomerasa que forma puentes disulfuro entre los residuos de cisteína estabilizando la estructura plegada de muchas proteínas, y la peptidil-prolil isomerasa (PPIasa), que cataliza la isomerización de enlaces peptídicos que implican residuos de prolina facilitando el replegamiento de algunas proteínas (Cooper y col., 2000).

5. 1. 1. Familia Hsp70. DnaK y su cofactor DnaJ.

Las Hsp70 son una familia de chaperonas altamente conservadas en los procariotas que juegan un papel central en la homeostasis de la célula mediando el plegamiento, la degradación, el transporte y la reestructuración de complejos de otras proteínas (Thompson y col., 2012).

Ampliamente estudiada en *Escherichia coli* y otros modelos biológicos, DnaK es un principal representante de esta familia en los procariotas (Thompson y col., 2012). Se encuentra en el citosol y está compuesta por un dominio N-terminal de unión a nucleótido (NBD, por sus siglas en inglés) y un dominio C-terminal de unión a sustrato (SBD, por sus siglas en inglés) (Bertelsen y col., 2009; Perrody y col., 2012). Ambos dominios están conectados por un *linker* flexible y regulados alostéricamente tanto para la unión del sustrato como para la hidrólisis del nucleótido (Thompson y col., 2012). Esta regulación alostérica da lugar a dos estados conformacionales de DnaK con diferente afinidad por el sustrato (Van Durme y col., 2009; Bonomo y col., 2010; Ahmad y col., 2011; Perrody y col., 2012; Thompson y col., 2012).

DnaK está, realmente, formando parte de un sistema de chaperonas junto con otras co-chaperonas como DnaJ, de la familia de las Hsp 40, y el factor de intercambio de nucleótidos GrpE (Ahmad y col., 2011; Perrody y col., 2012; Thompson y col., 2012). Estas co-chaperonas son las responsables de estimular el intercambio de ATP variando los estados de afinidad de DnaK por las proteínas sustrato (Van Durme y col., 2009; Bonomo y col., 2010; Ahmad y col., 2011; Perrody y col., 2012; Thompson y col., 2012).

DnaJ interacciona de manera directa con DnaK mediante el dominio-J, conservado universalmente (Ahmad y col., 2011; Perrody y col., 2012) y, a su vez, se une a las regiones hidrofóbicas que quedan expuestas en las proteínas mal plegadas (Van Durme y col., 2009; Thompson y col., 2012).

La chaperona DnaK unida a ATP presenta un estado conformacional abierto de baja afinidad por el sustrato. En este estado, DnaJ, unida a DnaK por el dominio-J, estimula la actividad ATPasa de ésta que hidroliza el ATP aumentando su afinidad por él. Esta unión está facilitada también por DnaJ que interacciona con los residuos hidrofóbicos

Introducción

de las proteínas sustrato mal plegadas. (Van Durme y col., 2009; Ahmad y col., 2011; Perrody y col., 2012; Thompson y col., 2012). Después el sustrato, la proteína mal plegada, es desplegada totalmente (Ahmad y col., 2011). El factor de intercambio de nucleótidos GrpE actúa después provocando la vuelta al estado conformacional de baja afinidad mediante el intercambio de ADP a ATP (Van Durme y col., 2009; Bonomo y col., 2010; Ahmad y col., 2011; Perrody y col., 2012; Thompson y col., 2012). Como consecuencia la proteína que ha sido desplegada se libera de DnaK y queda libre para ser plegada correctamente por otras chaperonas (Ahmad y col., 2011).

5. 1. 2. Familia Hsp 60. El sistema GroEL/GroES.

Los miembros de la familia de proteínas Hsp60 son conocidos con el nombre de chaperoninas. Éstas son las encargadas de facilitar el plegamiento de otras proteínas desde una conformación incorrecta o desplegada hacia su conformación nativa ante una situación de estrés. (Cooper y col., 2000).

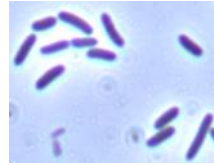
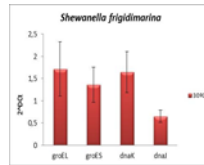
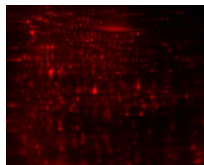
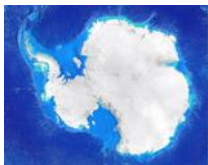
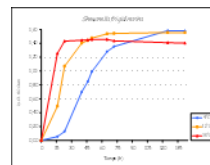
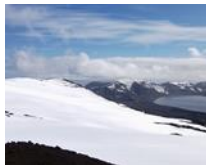
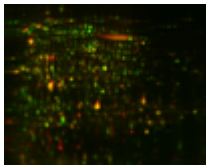
La respuesta "*heat shock*" bacteriana, y frente a otras situaciones de estrés celular, se caracteriza por los elevados niveles de expresión de un notable número de complejos de chaperonas incluyendo el formado por GroEL y GroES (Ventura y col., 2004), co-chaperonina de la familia Hsp10 (Beckerman, 2005).

Este sistema de chaperonas es una maquinaria molecular ATP-dependiente que tiene como sustrato proteínas mal plegadas y promueve su correcto plegamiento (Bukau y col., 1998).

La proteína GroEL es un homo-oligómero formado por 14 subunidades que se distribuyen en dos anillos heptaméricos dejando una cavidad interior (Madan y col., 2008; Albert y col., 2010; Kovács y col., 2010). Cada subunidad de estas catorce posee tres dominios; uno apical por el que se asocia la co-chaperonina GroEL y donde se va a interaccionar con el sustrato a través de los residuos hidrofóbicos; otro dominio situado entre los dos anillos donde se une el ATP, y el tercer dominio que pone en

contacto a los dos anteriores (Kovács y col., 2010). Así, los anillos están dispuestos de manera que forman un doble toroide que forma una especie de cápsula cuando se une GroES interaccionando a modo de “tapa”. (Madan y col., 2008).

El ciclo de plegamiento de este sistema GroEL/GroES o GroELS (figura 15) comprende un primer paso de unión del sustrato, a través de los residuos hidrofóbicos que quedan expuestos en las proteínas mal plegadas (Sun Park y col., 2006) al dominio apical del anillo cis seguido de la unión de GroES y de ATP. Estas uniones promueven un cambio conformacional en los anillos que hace que la cavidad interna sea hidrofílica y realice el encapsulamiento de la proteína sustrato (Albert y col., 2010) entre la cavidad de GroEL y la “tapa” que supone GroES en el complejo (Kovács y col., 2010). Aquí se da el empaquetamiento y correcto plegamiento de la proteína. Cuando GroEL y el ATP que es hidrolizado en el anillo cis, se unen al otro anillo, al trans, se libera la proteína ya bien plegada y eso también supone la liberación de GroES (Albert y col., 2010; Kovács y col., 2010; Ventura y col., 2004). La proteína se libera completamente plegada o no, en cuyo caso será necesario que realice otro ciclo a través del complejo GroELS (Ventura y col., 2004; Madan y col., 2008).



Considerando la influencia que la temperatura ejerce sobre los patrones de distribución de los organismos parece claro que la adaptación a ella a niveles molecular, celular y fisiológico representa un rasgo ubicuo en la evolución. Con el estudio de estas adaptaciones podemos tratar de identificar los componentes moleculares críticos que limitan el desarrollo de la vida en estos términos y establecer los umbrales de perturbación y adaptación térmica de las especies bacterianas seleccionadas.

Este estudio parte de la intención de encontrar algunas de las claves de la adaptación a la temperatura comparando el comportamiento, de dos especies psicrófilas (*P. frigidicola* y *S. frigidimarina*) frente a otra mesófila (*S. oneidensis*).

Así, definimos nuestros objetivos como los siguientes:

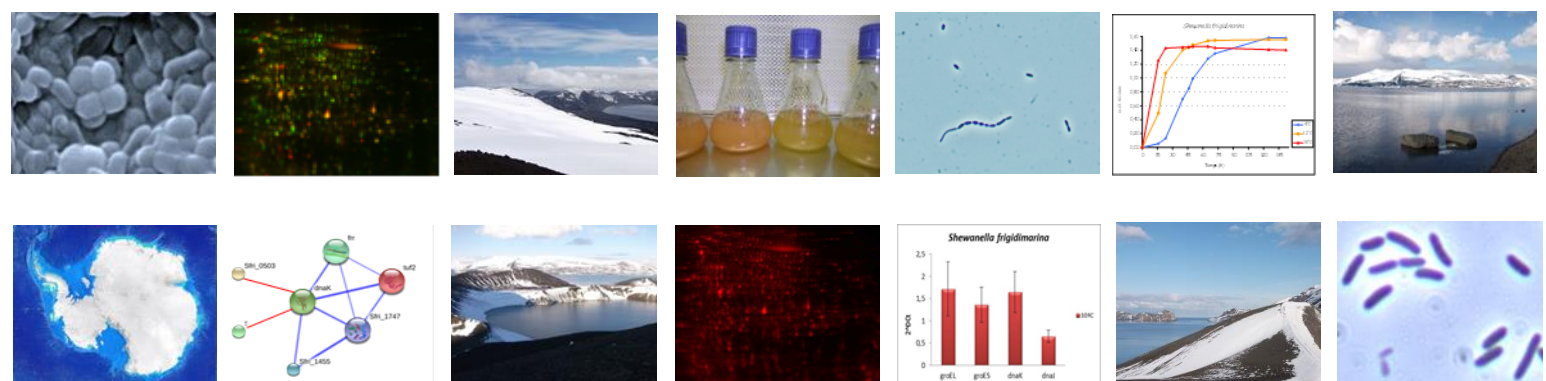
1. Estudiar los límites de temperatura a los que pueden crecer las bacterias seleccionadas y el comportamiento de sus cultivos expuestos a temperaturas de crecimiento próximas a estos límites.
2. Comparar las relaciones entre genomas frente a ambientes en relación a la similitud en las estrategias de adaptación a distintas temperaturas: Similitudes y diferencias derivadas de la comparación de dos especies bacterianas del mismo género (*S. frigidimarina* y *S. oneidensis*) que comparten gran parte de su genoma y, a su vez, dos especies bacterianas de distinto género pero que comparten un mismo ambiente de procedencia geográfico y térmico (*S. frigidimarina* y *P. frigidicola*).

Objetivos y planteamiento

3. Analizar la repuesta y la maquinaria implicada en los mecanismos moleculares potencialmente adaptativos a cambios de temperatura de las especies seleccionadas a nivel de ARNm y proteínas, estableciendo posibles relaciones funcionales de éstas frente a situaciones de estrés térmico.
4. Optimizar un sistema para la detección cuantitativa in vivo de los mecanismos moleculares de la adaptación a la temperatura. Este sistema combina técnicas de RT-QPCR con inmunoprecipitación con anticuerpos específicos y con técnicas de proteómica.

Este grupo de bacterias es un buen punto de partida para nuestro objetivo ya que los psicrófilos son organismos que han hecho frente de manera exitosa a los retos que presenta el ambiente al que se han adaptado: bajada de la energía térmica y aumento de la viscosidad. Puesto que las proteínas son el objetivo central de esta adaptación porque son las que controlan el equilibrio e intercambio entre sustratos y productos, el ensamblaje de macromoléculas, el dinamismo de los ácidos nucleicos y el adecuado plegamiento de otras proteínas, se emplean, entre otras, aproximaciones proteómicas.

Materiales y métodos



1. Especies bacterianas de estudio.

Las especies bacterianas para este estudio, *Shewanella oneidensis* (MR-1, 700550™) y *Shewanella frigidimarina* (ACAM 591, 700753™), se adquirieron de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH) y la especie *Psychrobacter frigidicola* (ACAM 304, 700361™) en la colección americana ATCC®). A partir de viales de las cepas de cada especie conservadas en glicerol y almacenados a -80°C se prepararon preinóculos en tubos de 15 ml que contenían 5 ml de medio de cultivo líquido y 100µl del vial.

Cuando los preinóculos de cada especie alcanzaron la mitad de su fase exponencial de crecimiento, correspondiente a una densidad óptica, medida a 600nm, de aproximadamente 0,5, se inocularon matraces Erlenmeyer, por triplicado para cada especie y condición, con 500µl de dicho preinóculo en un volumen total de 100 ml de medio de cultivo, Marine Broth 2216 (MB), para *S. frigidimarina* y *P. frigidicola* y Luria-Bertani Broth (LB) para *S. oneidensis*.

2. Condiciones y medios de cultivo.

2. 1. Condiciones de cultivo.

Los matraces se incubaron durante 5 días a 4°C, 12°C y 30°C en condiciones aeróbicas con una agitación de 150 rpm tomando, durante ese tiempo, medidas de la densidad óptica (D.O.) a 600nm en espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys™) de cada cultivo hasta alcanzar de forma clara la fase estacionaria del crecimiento. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos se centrifugaron en tubos de

Materiales y métodos

polipropileno de 50ml durante 20 minutos a 10,000 x g y 4°C con un posterior lavado con tampón fosfato salino (PBS) estéril y las mismas condiciones de centrifugación.

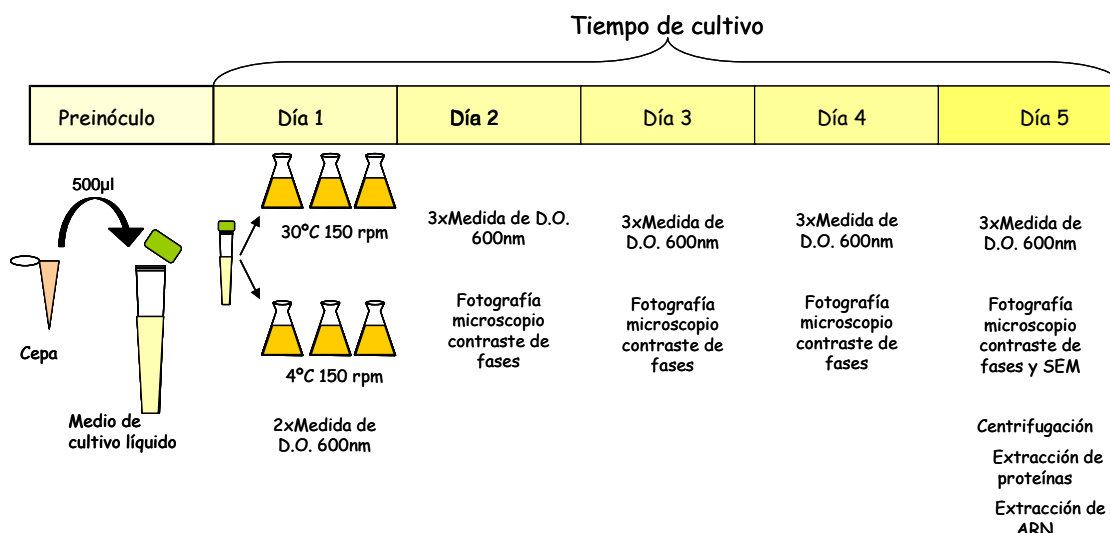


Figura M1. Esquema de actuación de inicio y desarrollo de los cultivos desde el preinóculo hasta el tiempo final de 5 días. Se señalan las medidas de D.O. tomadas en todo el proceso así como un control visual al microscopio del tamaño de las células y la pureza del cultivo. A tiempo final, se centrifugaron los cultivos para obtener el material necesario (ARN y proteínas) para las técnicas de electroforesis monodimensional, western-blot, RT-PCR, clonación e identificación por secuenciación, 2D-DIGE e inmunoprecipitación.

Paralelamente al crecimiento de los cultivos y la medida de la densidad óptica se realizaron observaciones diarias de los mismos para controlar, además de la pureza del cultivo, que el aumento de la densidad óptica no fuera debido al crecimiento en tamaño de las células.

Se contaron el número de células total a tiempo final en cada cultivo utilizando la cámara de Neubauer bajo el objetivo de 40x aumentos del microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX41, Alemania).

Además, se cultivó una batería de tubos de cada especie a las temperaturas de 0°C, 4°C, 15°C, 20°C y 30°C de los que se obtuvo el extracto de proteína total para hacer un seguimiento y comparar las variaciones en el perfil de proteínas mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en las distintas condiciones y especies.

2. 2. Medios de cultivo.

Luria-Bertani. 20g de LB Broth Base (BD Difco™, USA) en 1L de H₂O milliQ. Se disuelve bien calentando y agitando y se esteriliza autoclavando 15 minutos a 121°C.

Marine Broth. 42g de Artificial Sea Water (BD Difco™, USA), 5g de Bacto™ Peptona (BD Bacto, USA) y 1g de Bacto™ Yeast Extract (BD Bacto, USA) en 1L de H₂O milliQ. Se disuelve calentando (50°C) y agitando. Se esteriliza autoclavando 15 minutos a 121°C o por filtración.

Terrific Broth. 47,6g de Terrific Broth, modified (Sigma Aldrich, USA), 8ml de glycerol y 1L de H₂O milliQ. Se disuelve bien calentando y agitando y se esteriliza autoclavando 15 minutos a 121°C.

3. Clonaje y secuenciación.

3.1. Extracción de ADN genómico.

A partir del cultivo congelado se realiza el protocolo de extracción de ADN genómico utilizando el kit BIO 101 G NOME®. Con el material genético aislado y resuspendido en agua libre de enzimas Dnasas y Rnasas se procedió a su cuantificación y comprobación en el nanodrop (NanoDrop Int) y posterior electroforesis en gel de agarosa.

3. 2. Amplificación.

Se amplificó el ADN aislado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (GeneAmp PCR System 9700) utilizando los *primers* universales de bacterias del cromosoma 16S y la enzima Accuprime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA).

Materiales y métodos

Al término de la reacción se purificaron los productos de PCR con el kit Qiagen PCR purification kit columns (Qiagen, CA).

3. 3. Ligación.

Tras la purificación del producto de PCR se llevó a cabo la reacción de ligación de estos con el vector de clonación pCR II-TOPO® pCR®II-TOPO® Vector (Invitrogen, USA) que contiene un gen de resistencia a la ampicilina.

3 .4. Transformación.

Con el producto resultante de la ligación se transformaron células competentes de *Escherichia coli* One Shot® Mach1™-T1^R (Invitrogen, US) que se sembraron en placas de agar LB que contenían ampicilina como agente selectivo del crecimiento e indicador de la eficiencia de transformación. Además, estas placas contienen (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) como agente indicador de la eficiencia de ligación (colonias blancas).

3. 5. Selección y cultivo de colonias transformadas.

Las colonias blancas fueron aisladas y sembradas en otra placa multipocillo con medio de cultivo líquido Terrific Broth (TB) con ampicilina e incubadas durante un día a 37°C y agitación moderada.

3 .6. Extracción del ADN plasmídico y reacción de secuenciación.

De estos cultivos se extrajo el ADN plasmídico que contiene el inserto de ADN extraído y amplificado de los cultivos iniciales. Se realizó la reacción de secuenciación con fluorocromos marcados según el método de Sanger en un secuenciador ABI 3730 automatic sequencer (GE Healthcare).

Los datos obtenidos se introdujeron en las bases de datos de NCBI¹ para identificar y contrastar mediante BLAST múltiple que efectivamente trabajamos con las especies elegidas y que había ausencia de contaminación.

4. Observación microscópica de los cultivos.

4. 1. Microscopía óptica.

La morfología celular de cada especie y el seguimiento visual microscópico de los cultivos se realizó depositando una gota de cultivo líquido en un porta-objetos que se examinó directamente en un microscopio de contraste de fases (Olympus BX41, Hamburgo, Alemania) con el objetivo de 100 aumentos y utilizando luz transmitida.

Se tomaron imágenes CCD (Olympus DP70) y el programa informático DP Manager (Olympus optical).

4. 2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para la preparación de las muestras se filtraron 20µl de cada cultivo en fase estacionaria a través de un filtro con tamaño de poro de 0,22µm (GTTP Millipore, USA). Las células inmovilizadas en el filtro se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS y, tras 3 lavados consecutivos con PBS, se procedió a la deshidratación de éstas con sucesivos lavados de etanol en concentraciones crecientes hasta finalizar con dos pases de etanol 100%. Se dejó secar toda la noche en una caja porta-muestras. El centro del filtro se recortó, después, a la medida de la plataforma metálica sobre la que se fijó y se metalizó con un metalizador JEOL JSM-5600 LV Equipment (JEOL, Tokyo, Japan) la muestra con oro-paladio para su observación en el SEM (EDX, INCA X-Sight, Oxford).

5. Obtención del ARN total.

5. 1. Extracción de ARN total.

A partir del sedimento de 1,5 ml de cultivo (tres réplicas biológicas por cada condición de cultivo, 4°C y 30°C) se extrajo el ARN total de las células con TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), método que consta de un primer paso de homogenización del sedimento con el reactivo TRIzol Reagent, separación en fases añadiendo cloroformo, precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol y reposo a -80°C y lavados finales con etanol frío. El sedimento obtenido se resuspendió en DEPC-Treater Water (Ambion®) y calentando, además, a 55-60°C durante 10 minutos para aumentar el rendimiento.

5. 2. Tratamiento enzimático con Dnasa I.

Una vez resuspendidas tras la extracción de ARN las muestras se trataron con la enzima Dnasa I (Ambion®) para eliminar el ADN genómico presente que suele precipitar junto al ARN e interferiría en los resultados finales amplificándose en la PCR. Para la eliminación de la Dnasa I se utilizó el método de inactivación por fenol : cloroformo : agua (24: 25: 1) (Invitrogen, US) y posterior precipitación del ARN con isopropanol. Al término del proceso se midió la concentración de ARN en el nanodrop. También, antes y después del tratamiento enzimático, se visualizó el estado de las muestras en sendos geles de agarosa al 1%. Además, tras la eliminación del ADN se llevó a cabo una PCR con *primers* universales del cromosoma 16S para comprobar que no quedaba ADN en la muestra que amplificara y pudiera enmascarar los resultados de la PCR cuantitativa final. Los productos de PCR se comprobaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde no aparecía ninguna banda de amplificación a excepción del control positivo.

5. 3. Análisis de la integridad y calidad del ARN.

Para verificar la integridad del ARN las muestras se analizaron en un 2100 Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies, Alemania). Se guardaron a -80°C hasta su uso.

6. Extracción de proteínas.

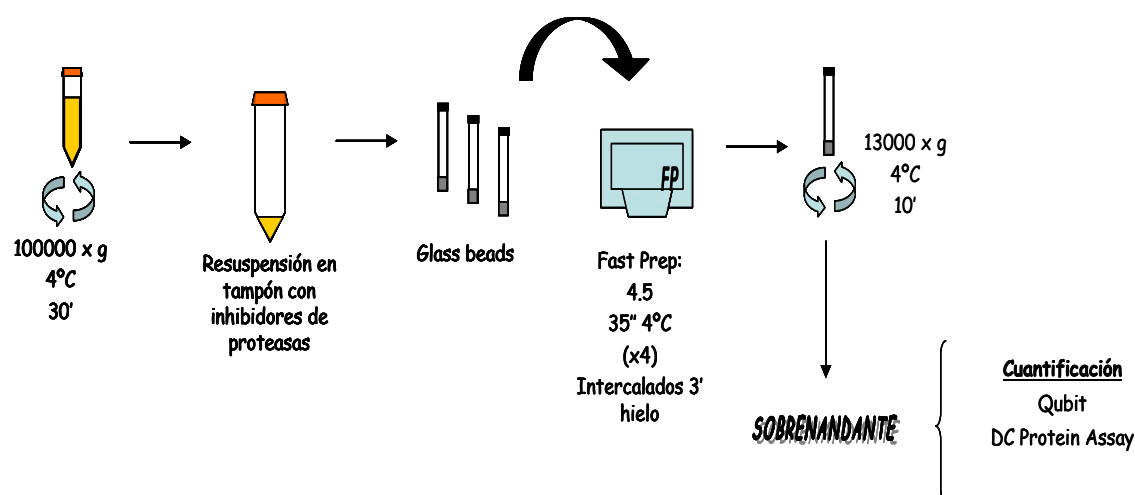


Imagen M2. Protocolo para la extracción de proteína total a partir de los sedimentos de los cultivos centrifugados a tiempo final.

Los cultivos en fase estacionaria, en el último día de cultivo, se centrifugaron a 100,000 x g, a 4°C durante 30 minutos con posterior lavado con tampón fosfato salino (PBS) y las mismas condiciones de centrifugación. El precipitado de células obtenido se homogeneizó con tampón isotónico (Tris HCl 1M pH: 7,5, EDTA 0,2M, NaCl 150mM, 0,2% SDS) con inhibidores de proteasas (Roche) en el caso de su posterior uso para electroforesis monodimensional o ensayos bidimensionales o con tampón IP Buffer A (Tris HCl 500mM pH:7,5, NaCl 200mM, 0,2% Triton X-100, 0,2% NP-40, etilendiaminotetraacético (EDTA) 5mM pH:8, cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM (PMSF) para su uso en electroforesis en condiciones no desnaturizantes y experimentos de inmunoprecipitación. El homogeneizado se lisó en criotubos que contenían un equivalente a 300µl de *glass-beads* mediante una *fast-prep* (FastPrep™ FP120) sometiéndolos a 5 pulsos de 30 segundos a velocidad 4.5 intercalando con períodos de reposo en hielo de 3 minutos.

Materiales y métodos

Se centrifugaron, después, los críotubos, a 13,000 x g durante 5 minutos recogiendo el sobrenadante donde se encuentran las proteínas en suspensión. Se calculó la concentración de proteínas extraídas en cada muestra utilizando el kit comercial BioRad DC™ Protein Assay (BioRad, USA) en el caso de haber sido homogeneizados los cultivos con tampón IP Buffer A o el kit Qubit® Protein Assay kit (Invitrogen, USA) cuando el tampón usado fue el isotónico con inhibidores de proteasas.

Las muestras extraídas con tampones que contienen sales y detergentes se precipitaron y limpiaron mediante el protocolo de metanol-cloroformo-agua o con el kit comercial 2D-clean up kit (GE Healthcare). Se hicieron alícuotas de las muestras de 150 µl y se conservaron a -80°C hasta su uso.

7. RT-PCR cuantitativa.

Se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-QPCR) para la comparación de la expresión de los genes que codifican las chaperonas GroEL, GroES, DnaK y DnaJ entre las muestras de 4°C y 30°C de las especies *S. oneidensis* y *S. frigidimarina*. Para ello se realizó un ensayo de cuantificación relativa entre las muestras mencionadas utilizando como molde ADNc sintetizado a partir del ARN total extraído y empleando como fluoróforo no específico SYBR-GREEN (Fast SYBR® Green Master Mix, Life Technologies, USA) que se une de manera inespecífica a la cadena de doble hélice.

7. 1. Síntesis de ADNc.

Con las muestras de ARN previamente extraídas (apartado 5) se sintetizó el ADNc correspondiente mediante el kit Superscript VILO (Invitrogen, USA). Para tratar de controlar las variaciones resultantes de la reacción de retrotranscripción se introdujo

en cada muestra, previamente, el ARN de un transcrito de pTri-Xef utilizando MEGAscript® Kit (Ambion®) en una concentración mil veces menor que éstas.

Se comprobó la capacidad de replicación del ADNc sintetizado mediante PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa. Este ADNc se empleó como molde para la reacción de PCR a tiempo real tanto para el ensayo de la eficiencia de los primers como para el desarrollo de la RT-QPCR para la cuantificación relativa.

7. 2. Diseño de primers.

Se diseñaron primers, con las características específicas para su uso en PCR cuantitativa, para los genes de las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES además de para dos candidatos a genes *housekeeping* en cada especie seleccionados tras consulta bibliográfica y para el *spike* pTri. Los genes *housekeeping* fueron triosa fosfato isomerasa A (tpiA) y dihidrofolato reductasa (dhfr) para *S. oneidensis*. Para *S. frigidimarina* el factor de iniciación de la traducción IF-2 (infB) y el factor sigma-70 de la ARN polimerasa (rpoD).

El diseño se realizó utilizando el programa Primer 3 (Ye y col., 2012) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con los siguientes parámetros (tabla M1).

Tabla M1. Parámetros de búsqueda en el diseño de cebadores para RT-QPCR .

Min total mismatches	4
Min 3' end mismatches	2
Defined 3' end region length	5
Mismatch threshold to ignore targets	6
Misprimed product size deviation	3000
Max number of Blast target sequences	50000
Blast E value	30000
Blast word size	7
Max candidate primer pairs	50
Min PCR product size	120
Max PCR product size	220
Min Primer size	15
Opt Primer size	20
Max Primer size	25
Min Tm	59
Opt Tm	60
Max Tm	61
Max Tm difference	1
Repeat filter	AUTO
Low complexity filter	Yes

Materiales y métodos

Las secuencias de los cebadores diseñados para cada especie y el tamaño del producto de amplificación se detallan en las tablas M2.1 y M2.2.

Tabla M2.1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la QPCR a tiempo real para *S. oneidensis* y tamaño de los fragmentos amplificados.

Gen	Cebador	Secuencia (5'→3')	Amplificación (pb)
groEL	Directo	TGGTACCTGGCGGCGGTGTA	134
	Reverso	CGCGATTTGACGCAGTGGCG	
groES	Directo	TCGCGGGGAAGTGCTTGCAG	173
	Reverso	TGGCCATCAGGTCAGCTTCTGACA	
dnaK	Directo	GAGCCTGCACCACGTGGCAT	181
	Reverso	CGTGGGCTTCAGCGTCACGT	
dnaJ	Directo	ATGGCGGCGCGGGAGATTTC	215
	Reverso	CGCACCGCTGCCGTCACATA	
tpiA	Directo	GTGGGAGAGTCGGGTCCAGCA	173
	Reverso	TGCGCCTGCTCTGGTGTAGC	
dhfr	Directo	TGCTAAACGGGTTGCTGGCGA	194
	Reverso	CGGCGCTTATACTCGGCTGGG	

Tabla M2.2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la QPCR a tiempo real para *S. frigidimarina* y tamaño de los fragmentos amplificados.

Gen	Cebador	Secuencia (5'→3')	Amplificación (pb)
groEL	Directo	GCGCGGTATCGACAAAGCGG	179
	Reverso	GCGCTTGGCCTTCTTCAACGG	
groES	Directo	GGCGGTATCGTGCTTACAGGCA	135
	Reverso	GAAGATCACCACGTCGCCCCACTT	
dnaK	Directo	GCTGGCGATGCACTAGCTAGCG	198
	Reverso	GCCAGCATCGTGTGCTTGACCT	
dnaJ	Directo	CGGGCGAGTTTGGTGCTCCA	216
	Reverso	GTAGGCGGAACATGCGCCCA	
infB	Directo	AAAGGTCGTGGCCCTGTGGC	189
	Reverso	ACCTGCAGACGGCACACCAG	
rpoD	Directo	AGCCGCGATGGCAAACAATCGA	160
	Reverso	TGAGTTGCGACTGCGGAGTGTG	

7. 3. Ensayo de la eficiencia de primers.

Con el ADNc se preparó una placa de PCR de 96 pocillos para el ensayo de la eficiencia de los primers diseñados. En ella se utilizaron diluciones seriadas de una única muestra en la que se ven representados todos los genes que se quieren estudiar. Se tomó para ello una muestra procedente de un cultivo a 4°C de cada especie. Para llevar a cabo la reacción y su visualización final se empleó como fluorocromo inespecífico SYBR-GREEN (se une de manera inespecífica a la doble cadena de ácido nucleico) que se excita mediante luz azul (488nm) y emite luz verde (522nm). La reacción de PCR se llevó a cabo en Sistemas ABI Prism 7900 HT y las eficiencias se calcularon a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas tras realizar las reacciones de PCR en tiempo real de las diluciones seriadas.

7. 4. Cuantificación relativa.

Comprobada la eficiencia de los primers, que debe ser del 100% o muy cercana, se preparó una placa multipocillo con todas las muestras, tres réplicas biológicas para cada temperatura y duplicados técnicos para cada réplica. Se descartaron los genes *dhfr* y *rpoD* porque presentaban problemas en la amplificación. Se empleó SYBR-GREEN como fluorocromo inespecífico. Se utilizaron controles sin molde de ADNc (*no template control*, NTC) y controles de ARN (*no retrotranscription*, RT-).

El ensayo consistió en una cuantificación relativa de los genes de las chaperonas estudiadas entre las muestras tomadas de cultivos a temperatura de crecimiento de 4°C y de 30°C.

7. 5. Cuantificación de la expresión génica.

Para la cuantificación relativa de los genes de las chaperonas estudiadas en las muestras de 4°C y de 30°C, debido a la falta de genes *housekeeping* válidos y basándonos en que se partió de la misma cantidad de ARN en todas las muestras se realizó una cuantificación relativa utilizando el método normalizado frente a la unidad de masa µg de ácido nucleico de partida. Se tomó como calibradora la temperatura de 4°C cuantificando, así, la variación de la expresión en las muestras de 30°C con respecto a estas. Se utilizaron los datos relativos a la amplificación de pTri-Xef para tomar o descartar los datos de los genes objetivo en la cuantificación.

Este método a menudo es denominado como el método de ΔC_t porque las cuantificaciones se realizan en base al ciclo umbral (C_t) de cada muestra, es decir, en base al número de ciclo de amplificación en el que la fluorescencia generada por una muestra alcanza la línea umbral que corresponde al nivel de detección del amplicón por encima del ruido de fondo de la fluorescencia. Se obtiene una ratio siguiendo esta ecuación:

$$\text{Ratio}(30/4) = E^{C_t(4) - C_t(30)}$$

Donde E es la eficiencia de amplificación. Comprobada que esta eficiencia de amplificación de los cebadores era prácticamente del 100%, es decir que se asume que se duplica la cantidad de *template* en cada ciclo la cuantificación relativa de las muestras de 30°C sobre las de 4°C se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio}(30/4) = 2^{C_t(4) - C_t(30)} \text{ o } \text{Ratio}(30/4) = 2^{\Delta C_t}$$

$$\text{Donde } \Delta C_t = C_t(4) - C_t(30)$$

8. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida e inmunodetección mediante western-blot.

8. 1. Preparación de las muestras.

A partir de los extractos de proteínas, se prepararon muestras de 30µg de proteína para cargar en geles de electroforesis, con una proporción 1:3 de tampón de carga (18,6ml de Tris 1M, 12,3ml de glicerol, 6ml de β-mercaptoetanol, 9g de dodecil sulfato sódico (SDS), 25mg de bromofenol, enrasando hasta un volumen final de 100ml con agua destilada y calentando durante 3 minutos a 90°C.

8. 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La electroforesis transcurrió a 200V y 400mA (PowerPac 200, BioRad) durante 60 minutos en geles discontinuos de acrilamida-bisacrilamida (GE Healthcare, 40%) 5%-12% (2,6% c). Como marcador de pesos moleculares se utilizó el estándar *Low Molecular Weight* (LMW) (GE Healthcare).

Los geles se tiñeron con plata o azul de Coomassie en unos casos, o bien, se transfirieron a membranas de polivinil-difluoride (PVDF) (GE Healthcare) para su posterior inmunodetección.

8. 3 Transferencia de proteínas.

Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de PVDF mediante transferencia húmeda. El tampón de transferencia utilizado se compone de 100ml de metanol, 50ml de Tris-Gly 10x y 350ml de H₂O_d. Las condiciones de la transferencia fueron 1 hora y 15 minutos de duración a 100V y 400mA (PowerPack 3000, BioRad) y en frío.

El bloqueo de la membrana se realizó durante toda la noche en cámara de 4°C en PBS-Blotto al 5% (5g *blocking agent* en 100ml de PBS) con un 0,5 % de SDS, para evitar uniones inespecíficas en las posteriores incubaciones con anticuerpo.

Materiales y métodos

8. 4. Inmunodetección.

Después del bloqueo la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos utilizados y la dilución a la que se empleó cada uno se detallan en la tabla M3.

Tabla M3. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de las chaperonas DnaK, GroEL, GroES y DnaJ.

ANTICUERPO	PM PROTEÍNA	HOSPEDADOR	TIPO	DILUCIÓN
DnaK	70kDa	ratón	monoclonal	1:1000
GroEL	60kDa	ratón	monoclonal	1:1000
DnaJ	41kDa	conejo	policlonal	1:5000
GroES	10kDa	conejo	policlonal	1:10000

Se realizaron 3 lavados de 15 minutos y uno de 30 minutos de la membrana con PBS-Tween al 0,05% (0,5ml de Tween-20 en 1L de PBS) entre el bloqueo y el primer anticuerpo y tras cada incubación con los anticuerpos primario y secundario. Se incubó la membrana durante una hora con el anticuerpo secundario frente al hospedador del primario (anti-mouse o anti-rabbit) en cada caso a concentración 1:1000 en PBS-Blotto 1%.

La membrana se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial de ECL (GE Healthcare).

8. 5. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.

Los geles para esta electroforesis fueron preparados sin SDS al igual que los tampones empleados. El gel separador se preparó a una concentración de acrilamida-bisacrilamida del 5,5%. Las muestras, preparadas en un tampón sin β -mercaptoetanol, no se calentaron. Se utilizaron dos marcadores de pesos moleculares conocidos, los

estándares Broad Range Prestained (BPR) (BioRad) y Low Molecular Weight (LMW) (GE Healthcare).

Al término de la electroforesis los geles, que se hicieron por duplicado para cada especie, fueron teñidos con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution, BioRad) y con el protocolo de tinción de plata compatible con MALDI-TOF.

Para la búsqueda de complejos formados por GroEL y otras proteínas se realizaron dos tipos de abordaje. El primero, consistía en recortar las bandas aparecidas en el gel de la electroforesis no desnaturizante e identificarlas mediante huella peptídica.

En el segundo, para extraer las proteínas de las bandas escindidas del primer gel éstas se disolvieron en tubos eppendorf que contenían 20µl de H₂O y 20µl de Tampón Tris 1M pH=7,6. Se calentaron en termobloque a 90°C durante 15 minutos con agitación moderada y posteriormente se terminaron de disgregar las bandas empleando un émbolo. Tras una centrifugación de un minuto y 13,2 x g se extrajo el sobrenadante y se preparó para llevar a cabo una electroforesis en gel desnaturizante del que se recortaron las bandas resultantes para su identificación por huella peptídica.

9. Tinción con plata en condiciones compatibles con MALDI-TOF.

Comprende una primera fase de fijación en etanol y ácido acético; a la que le sigue la de sensibilización en una solución que contiene etanol, tiosulfato sódico y acetato sódico. Después de fijar y sensibilizar se llevó a cabo la reacción con nitrato de plata tras la que se realizaron dos lavados en agua destilada. Para el desarrollo de la reacción se sumergió el gel en una solución de carbonato sódico. Este paso se controló visualmente hasta ver aparecer las bandas de proteínas deteniendo, finalmente, la reacción con una solución de EDTA.

10. Inmunoprecipitación de proteínas.

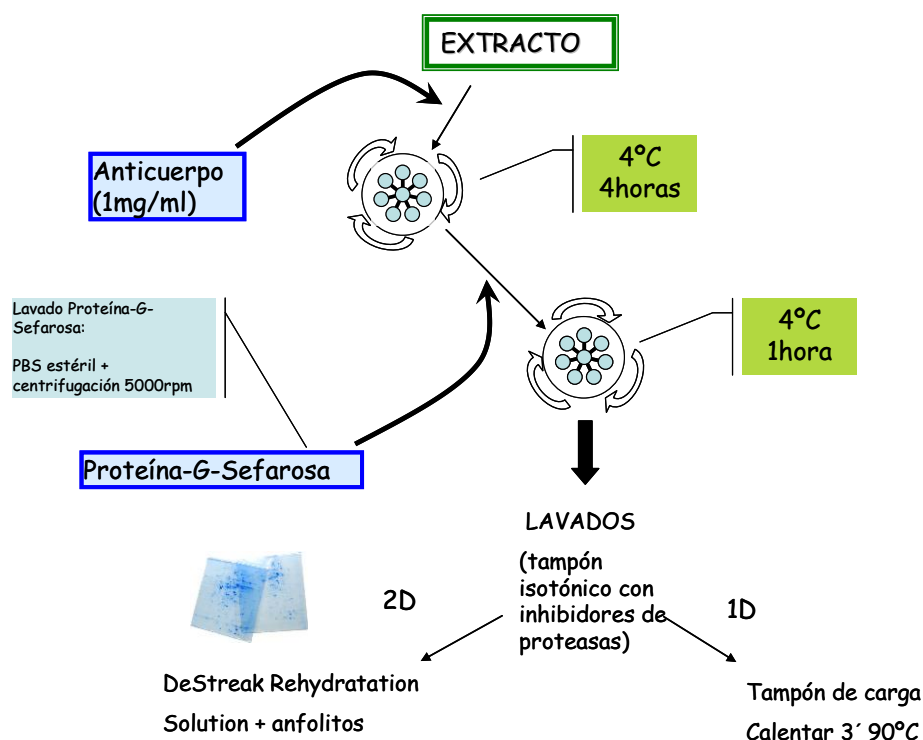


Figura M3. Esquema del protocolo para la inmunoprecipitación de los extractos de proteínas con anticuerpos específicos anti- GroEL y anti-DnaK para las tres especies estudiadas y las dos condiciones de temperatura ensayadas (4°C y 30°C).

La inmunoprecipitación se realizó a partir de los extractos de proteínas de *S. oneidensis*, *S. frigidimarina* y *P. frigidicola* utilizando el método de unión a proteína G-Sefarosa (GE Healthcare) y los anticuerpos anti-GroEL y anti-DnaK (Assay Designs, USA).

La proteína G-Sefarosa se lavó con agua destilada y PBS estéril. Se incubaron, primero, 600µg del extracto de proteínas con 3µl (1mg/ml) del anticuerpo correspondiente en cada caso, con rotación y en cámara de 4°C durante 4 horas para, dar lugar a la unión específica del anticuerpo con la proteína. Posteriormente se añadieron 30µl de proteína-G-Sefarosa lavada y se incubó durante una hora en las mismas condiciones. Después, se lavó la mezcla con tampón isotónico con inhibidores de proteasas para eliminar las uniones inespecíficas centrifugando 5 minutos a 5000 rpm y desechando el sobrenadante. Las muestras se guardan a -20°C hasta su uso.

11. Electroforesis bidimensional.

11. 1 Electroforesis diferencial bidimensional en gel (2D-DIGE) de extracto de proteína total.

Se compararon los niveles de expresión diferencial del proteoma total de las especies estudiadas expuestas a las temperaturas de crecimiento ensayadas, 4°C y 30°C, mediante experimentos de electroforesis diferencial bidimensional en gel.

11. 1. 1. Preparación de muestras.

Previo al experimento DIGE se realizó una comprobación del estado de las muestras, limpieza y precipitación de las mismas, cuantificación por el método de Bradford y una prueba a pequeña escala de la adecuación de las muestras a las condiciones de la electroforesis bidimensional.

11. 1 .2. Marcaje de las muestras.

Tras la comprobación anterior se marcaron diferencialmente las muestras de manera covalente con fluoróforos (CyDye™ DIGE Fluor, GE): De las cuatro réplicas biológicas de cada temperatura se marcan dos de 4°C y otras dos de 30°C con Cy3 y las otras dos de 4°C y de 30°C con Cy5. Además un *pool* con las dos condiciones se marcó con Cy2 para ser utilizado como estándar interno del experimento. Las muestras se incubaron en hielo y oscuridad para permitir la reacción de marcaje.

11. 1. 3. Primera dimensión.

Con las muestras marcadas y mezcladas en un único tubo se llevó a cabo la primera dimensión, el isoelectroenfoque (IEF), que separa las proteínas atendiendo a su punto isoelectrónico. Para ello se emplearon tiras IPG (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare) de

Materiales y métodos

pH 3-11 NL (no lineal) de 24cm y se cargaron las muestras por el método de *cup-loading*. Se empleó un programa de IEF de 31h en el que se acumularon 75620 Vh y que aplicó 100 μ A por cada tira a una temperatura de proceso de 20°C.

11. 1. 4. Segunda dimensión.

Para la segunda dimensión, en la que las proteínas detenidas en su punto isoeléctrico (pI) se separan, ahora, por su peso molecular se emplearon geles de acrilamida-piperazida diacrilamida (PDA) del 12% T, 2.6 % C. La electroforesis transcurrió durante 17 horas y fueron aplicados 2 vatios por cada gel.

11. 1. 5. Análisis de imágenes DIGE.

Para la captura de imágenes se empleó un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400, GE Healthcare) con filtros de excitación/emisión correspondientes a la longitud de onda característica para cada fluorocromo (Cy3: 532/580nm, Cy5: 633/670nm y Cy2: 488/520nm). Se adquirieron las imágenes digitalizadas de los geles con cada fluorocromo por separado y conjuntamente con una resolución de píxel de 100 μ m. Usando el software ImageQuant v5.1 (GE Healthcare) se recortaron las imágenes para eliminar las partes del gel que no contenían manchas proteicas. Las imágenes obtenidas se importaron a los diferentes módulos del programa *DeCyder Differential Analysis Software* (GE), versión 7.0, con el que se realizó el procesamiento y análisis estadístico de las mismas. El módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) detecta y cuantifica las manchas de las tres imágenes resultantes de excitar cada fluoróforo. El módulo BVA (*Biological Variation Analysis*) permite el emparejamiento de imágenes, de las manchas proteicas detectadas, para obtener datos estadísticos sobre los niveles de expresión. Para visualizar la proteína total, los geles se tiñeron mediante el protocolo de Azul de Coomassie Coloidal (CCB).

Una vez procesadas las imágenes y analizados los resultados estadísticamente mediante los diferentes módulos descritos se seleccionaron las manchas como proteínas de interés aquellas con cambios de, al menos, +/- 2 veces en la ratio 4/30 y presentes en, al menos, 3 réplicas para ser recortadas del gel, digeridas con tripsina e identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (ionización/desorción por láser asistida por matriz) por huella peptídica (PMF y MS/MS).

De los datos obtenidos se realizaron las búsquedas combinadas PMF y MS/MS en las bases de datos (NCBI nr 081217 con 7463447 secuencias y 2570742364 residuos para *S. oneidensis*; NCBI nr 160909 con 9694989 secuencias y 3312496757 residuos para *S. frigidimarina*; NCBI nr 20131020 con 33055681 secuencias y 11532217697 residuos y NCBI nr 14042010 con 10866589 secuencias y 3703552722 residuos para *P. frigidicola*), utilizando previamente el motor de búsqueda MASCOT^{MT} (Matrix Science), para identificación de las proteínas con los siguientes parámetros de búsqueda especificados en la tabla M4.

Tabla M4. Parámetros de búsqueda en MASCOT para la identificación de proteínas.

Enzyme	Trypsin
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Oxidation (M)
Mass values	MONOISOTOPIC
Protein Mass	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	± 50 ppm
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	1

11. 2. Electroforesis bidimensional de extractos inmunoprecipitados.

Para la identificación de las proteínas que co-inmunoprecipitan con las chaperonas GroEL y DnaK en las especies de estudio a las dos temperaturas ensayadas, 4°C y 30°C, se realizó una separación, mediante electroforesis bidimensional, de las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos.

11. 2. 1. Limpieza de muestras.

Los extractos inmunoprecipitados se limpiaron mediante el método de metanol-cloroformo o usando el kit 2D up clean (GE Healthcare) para eliminar sobre todo el exceso de sales que pudiera haber en las muestras.

11. 2. 2. Primera dimensión.

Las tiras de gel IPG (immobiline Dry Strip Gel, GE Healthcare) de gradiente de pH 3-10 NL y 13 cm de longitud, se rehidrataron junto con la muestra en un tampón que contenía urea 8M, tiourea, CHAPS y el agente reductor DeStreak®. Se dejaron toda la noche en la bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Resuelling Tray, GE Healthcare). Después de la rehidratación las tiras, escurridas sobre un papel de filtro, se colocaron en la bandeja de cerámica que, a su vez, se sitúa en el equipo Ettan IPGphor 3 (GE) donde transcurre la primera dimensión, el isoelectroenfoque, en el que las proteínas se separan por su punto isoeléctrico. Éste se llevó a cabo a 20°C con un programa durante 25 horas en el que se acumularon 28000V.

11 . 2. 3. Equilibrado.

Terminada la primera dimensión las tiras se equilibraron en tampón que contenía urea, Tris-HCl, glicerol, iodoacetamida, bromofenol y SDS, realizando dos pases en agitación y a temperatura ambiente.

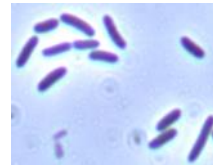
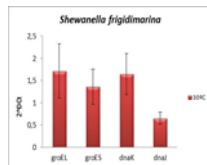
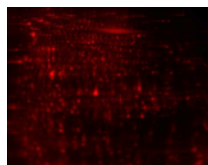
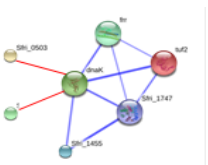
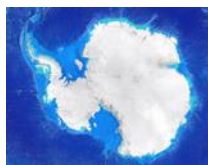
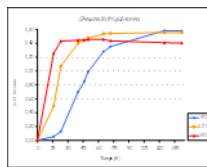
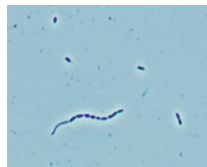
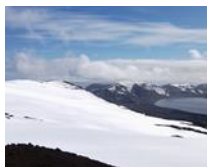
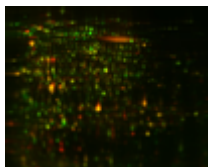
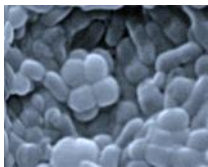
11 . 2. 4. Segunda dimensión.

Las tiras equilibradas se sometieron a SDS-PAGE en sistema vertical (mini- Protean® Tetra Cell, BioRad) con geles de acrilamida-bisacrilamida al 12% (BioRad). La electroforesis transcurrió a 200V y 400mA durante 60 minutos.

11. 2. 5. Tinción, captura de imágenes e identificación por espectrometría de masas.

Terminada la segunda dimensión los geles se tiñeron mediante tinción clásica sumergiéndolos en azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250 Staining Solution, BioRad) y, tras desteñirlos, se tomaron imágenes escaneando los geles. Se seleccionaron y recortaron manualmente las manchas para ser identificadas mediante espectrometría de masas con MALDI-TOF por huella peptídica (PMF) y MS/MS. Para la búsqueda en MASCOT™ de los datos obtenidos se utilizaron los parámetros indicados en la tabla M4 y la opción de búsqueda combinada.

Resultados



1. Principales características microscópicas y moleculares de las especies de estudio y su crecimiento en función de la temperatura.

1.1. Crecimiento de especies bacterianas en función de la temperatura.

Las curvas de crecimiento de las distintas especies estudiadas muestran un perfil muy similar bajo las condiciones de temperaturas a las que fueron sometidas (figura R1) aunque sus temperaturas óptimas de crecimiento definidas en la bibliografía sean dispares: 30°C para *Shewanella oneidensis*, 20°C para *Shewanella frigidimarina* y 15°C para *Psychrobacter frigidicola*, como se indica en el apartado 5 de la introducción.

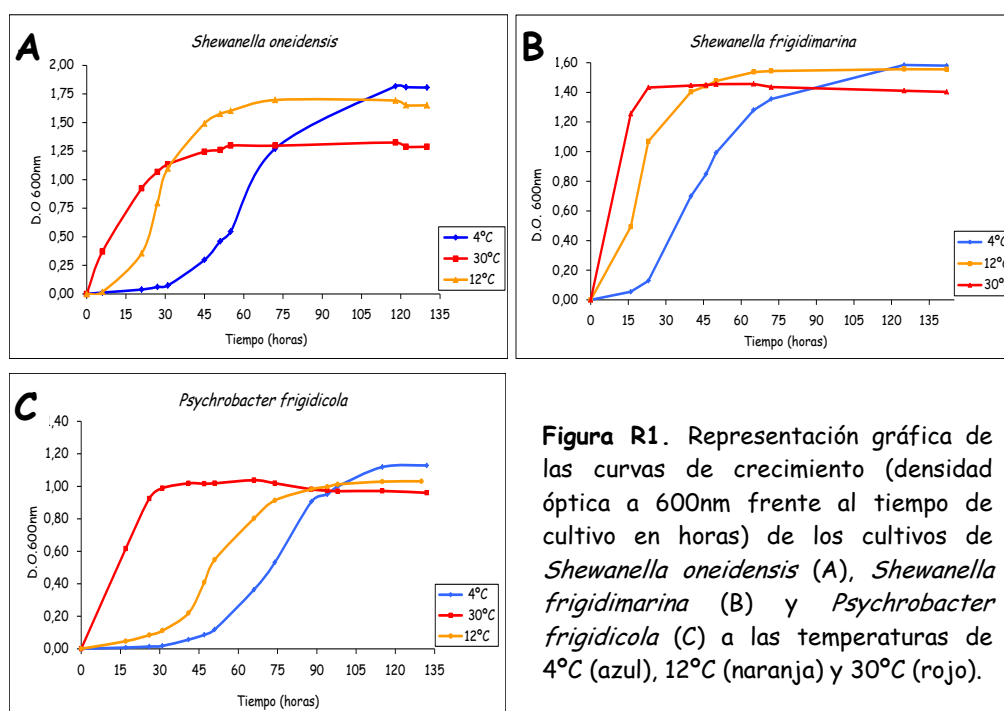


Tabla R1. Duración (en horas) de las fases de crecimiento (Lag: fase de retardo, Exp.: fase exponencial y Est.: fase estacionaria) de las tres especies a 4°C, 12°C y 30°C.

	<i>S. oneidensis</i>			<i>S. frigidimarina</i>			<i>P. frigidicola</i>		
	Lag	Exp.	Est.	Lag	Exp.	Est.	Lag	Exp.	Est.
4°C	38	76	18	25	67	40	46	54	32
12°C	18	26	86	5	35	92	35	47	50
30°C	0	35	95	0	18	114	0	29	103

Resultados

Las curvas descritas por el crecimiento de los cultivos de estas tres especies a 4°C tienen una fase inicial similar, al igual que ocurre comparando entre sí las curvas del crecimiento a 30°C, pero difieren si establecemos la comparación entre las dos temperaturas de crecimiento. Cuando el cultivo crece a 30°C no aparece la fase 'lag' o de retardo, el crecimiento se acentúa bastante ya desde las primeras horas, mientras que esta fase es bastante extensa en los cultivos a 4°C, independientemente de que se trate de la especie mesófila (figura R1.A), psicrotolerante (figura R1.B) o psicrófila (figura R1.C).

En la fase exponencial también se observan diferencias entre las dos temperaturas indicadas. La duración de esta fase es de aproximadamente el doble (tabla R1) en el caso de *S. oneidensis* y *P. frigidicola* y el triple para *S. frigidimarina* en las bacterias cultivadas a 4°C que en las cultivadas a 30°C.

Además, la biomasa, referida a la densidad óptica a 600nm, que alcanzan los cultivos, cuando el crecimiento ocurre a bajas temperaturas (4°C) es sensiblemente mayor en todas las especies de estudio que cuando el crecimiento ocurre a 30°C. Esto sugiere que el tiempo empleado por estos microorganismos en "acomodarse" a una temperatura de 4°C al iniciarse el crecimiento (fase de retardo) previamente a la fase exponencial, es algo que favorece una mayor eficiencia de crecimiento *a posteriori*.

Tomando como un valor intermedio de temperatura de crecimiento entre los extremos establecidos en nuestro estudio el valor de 12°C vemos que la curva descrita por las tres especies revela ciertas similitudes con las descritas a las temperaturas de 4°C y 30°C, aunque con algunas excepciones.

En primer lugar la fase de retardo, que no se aprecia en los momentos de medición ensayados en los cultivos de 30°C, es más corta en los cultivos crecidos a 12°C que la observada a 4°C. Centrándonos en cada caso, vemos que para *P. frigidicola* el

parecido entre el inicio de la curva de 12°C y 4°C es mucho mayor que en el caso de las otras dos especies. Para *S. frigidimarina* el mayor parecido en esta fase se da entre las curvas de 12°C y 30°C. Y en el caso de *S. oneidensis* la fase de retardo en la curva de crecimiento a 12°C es prácticamente intermedia a las correspondientes a 4°C y 30°C.

La especie que antes comienza a multiplicarse exponencialmente cuando es cultivada a 12°C es *S. frigidimarina* que lo hace dentro de las 10 primeras horas. *S. oneidensis* entra en fase exponencial a esta temperatura aproximadamente a las 18-20 horas desde el inicio del cultivo mientras que *P. frigidicola* dilata esta entrada hasta las 35 horas, aproximadamente, desde el inicio del cultivo.

La pendiente de esta fase en el cultivo de 12°C es mayor que la descrita por el crecimiento a 4°C e incluso que a 30°C para *S. oneidensis*. Para las otras dos especies la pendiente de la gráfica en fase exponencial en los cultivos de 12°C y 30°C es prácticamente la misma. En los tres casos la pendiente observada a 4°C es siempre menor que la de 12°C.

La entrada en fase estacionaria de los cultivos incubados a 12°C está retrasada con respecto a los de 30°C, que comienzan su crecimiento antes, y adelantada con respecto a los de 4°C, que emplean más tiempo en empezar a crecer. Esta diferencia, el lapso de tiempo entre el inicio de la fase estacionaria de la curva de 30°C y 12°C, es más marcada en la especie mesófila (*S. oneidensis*) y en la psicrófila estricta (*P. frigidicola*) que en la psicrotolerante (*S. frigidimarina*).

Además, la biomasa a 12°C al final del período de cultivo alcanza niveles según el valor de D.O. medido que en los tres casos se sitúa entre los obtenidos a 30°C y 4°C, si bien, en el caso de las especies mesófila y psicrotolerante se sitúa más cercano al valor obtenido a 4°C y en el de la psicrófila estricta lo hace más próximo al de 30°C.

Resultados

1. 2. Observación de la morfología celular.

S. oneidensis presenta una morfología bacilar y un tamaño de 4µm aproximadamente y suele organizarse agrupada en parejas o de forma individualizada (Figura R2).

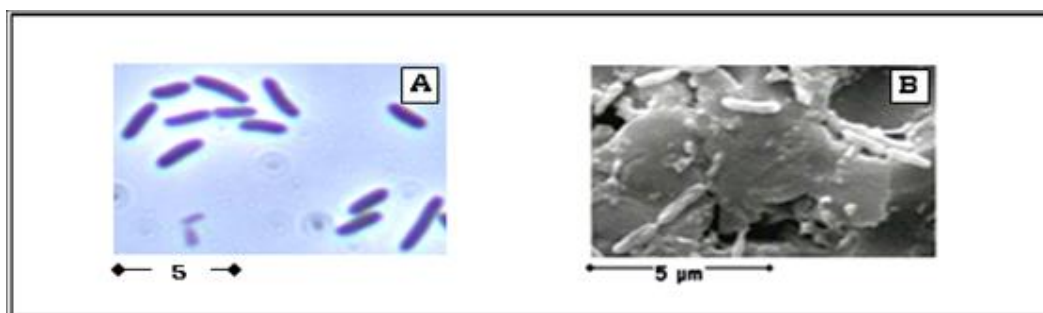


Figura R2. Imágenes de cultivos de *Shewanella oneidensis* tomadas mediante microscopio óptico (A) y microscopio electrónico de barrido metalizando con oro-paladio (B).

En las imágenes de *S. frigidimarina* al microscopio óptico (figura R3. A) se observa su tendencia a la organización en largas cadenas de varias células. Gracias a las imágenes más detalladas del microscopio electrónico (figura R3. B) se puede ver con claridad su morfología bacilar y su tamaño menor al de *S. oneidensis*.

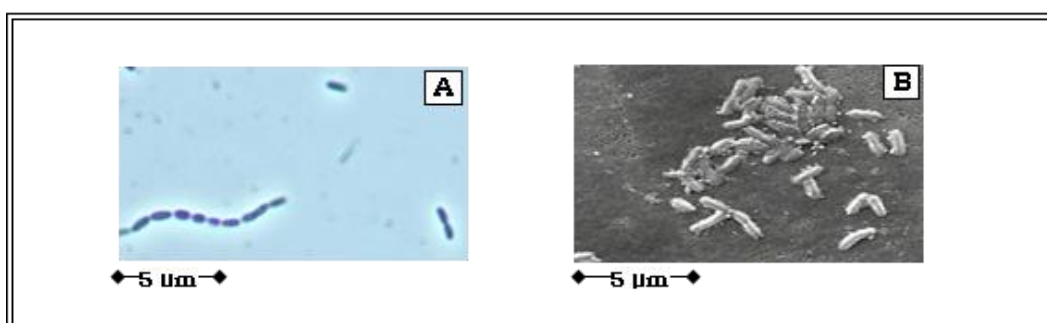


Figura R3. Imágenes de cultivos de *Shewanella frigidimarina* tomadas con microscopio óptico (A) y microscopio electrónico de barrido metalizando con oro-paladio (B).

En las imágenes tomadas tanto con microscopio óptico como electrónico de barrido (figura R4) de *P. frigidicola* podemos observar su morfología típica, que es más redondeada, así como el modo en el que suele presentarse agrupada bien formando tétradas o parejas.

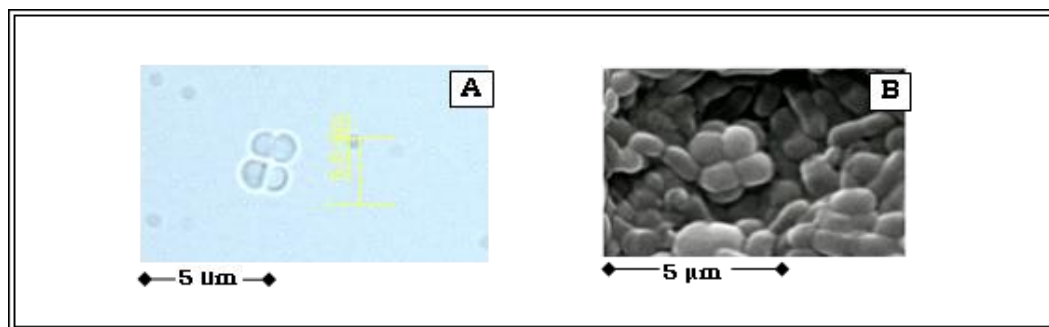


Figura R4. Imágenes de cultivos de *Psychrobacter frigidicola* tomadas con microscopio óptico (A) y microscopio electrónico de barrido metalizando con oro-paladio (B).

En ninguna de las tres especies se observaron cambios de tamaño celular a lo largo del periodo de crecimiento del cultivo.

1. 3. Cambios en el perfil electroforético de extractos de proteínas en las tres especies a distintas temperaturas de crecimiento.

La electroforesis monodimensional en geles de poliacrilimida de los extractos proteicos de *S. oneidensis* y *S. frigidimarina* cultivadas a 0°C, 4°C, 15°C, 20°C y 30°C revela diferencias en el patrón o perfil de proteínas así como en abundancia de algunas de ellas en función de la temperatura de crecimiento de cada cultivo (Figura R5).

A medida que va aumentando la temperatura de cultivo en el perfil de proteínas hay bandas que desaparecen, apareciendo otras que no se observaban, además de que algunas aumentan o disminuyen su intensidad en función de este parámetro.

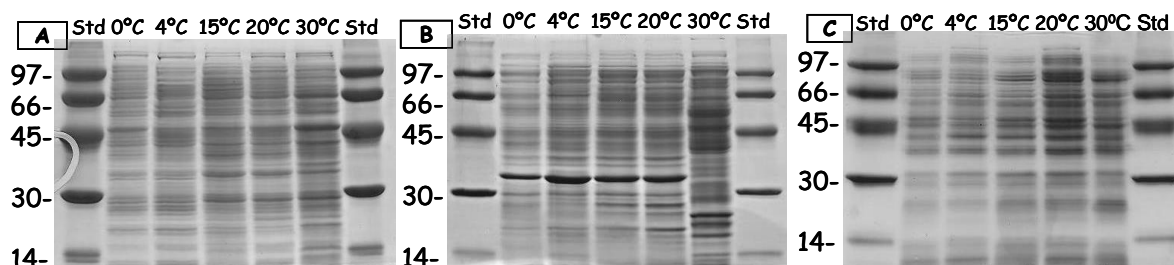


Figura R5. Electroforesis SDS-PAGE de extractos de proteínas a partir de cultivos a 0°C, 4°C, 15°C, 20°C y 30°C de las especies: *Shewanella oneidensis* (A), *Shewanella frigidimarina* (B) y *Psychrobacter frigidicola* (C). Se utilizó un estándar (Std.) de pesos moleculares (Low Molecular Weight de GE Healthcare) indicado a la izquierda de cada gel.

Resultados

Las máximas diferencias, en ambas especies, aparecen en los cultivos de 30°C con respecto al resto de temperaturas.

Para *S. oneidensis* se pueden agrupar cuatro rangos de temperaturas según el patrón de bandas. Hay ligeras diferencias en la mitad superior del gel, correspondiente a las proteínas de mayores pesos moleculares, entre las temperaturas de 0°C y 4°C constituyéndose así los dos primeros grupos. El patrón es muy similar en las temperaturas de 15°C y 20°C, el tercer grupo. Y, finalmente, en los extractos de cultivos de 30°C es donde se observan las diferencias más marcadas a todos los rangos de pesos moleculares, especialmente en las intensidades de bandas cercanas a 66kDa, 45kDa, 30kDa y 20kDa.

En el caso de *S. frigidimarina* de igual modo podemos establecer cuatro grupos de temperaturas a las que aparecen diferencias en el perfil de proteínas. Entre las temperaturas de 0°C y 30°C hay ligeras diferencias, pero bien distinguidas del grupo formado por las de 15°C y 20°C. La temperatura de 30°C es, de nuevo, la que muestra más diferencias con respecto al resto no sólo en las intensidades de ciertas bandas sino también en la aparición de bandas que no se veían en ninguno de los carriles anteriores entre 97kDa y 66kDa, ligeramente por debajo de 45kDa y un grupo marcado de 3 bandas entre 14kDa y 30kDa.

En el gel correspondiente a *Psychrobacter frigidicola* se observan pequeñas diferencias entre algunas bandas de la parte superior, las de mayor masa, en el carril correspondiente a los cultivos de 0°C con respecto al resto. El rango que va de 4°C a 30°C se muestra bastante similar, si bien, hay bandas de mayor intensidad en los extractos de los cultivos de 20°C y 30°C. El parámetro de temperatura parece tener una menor influencia sobre las variaciones en el perfil electroforético observable del

extracto de proteínas de esta especie, psicrófila estricta, con respecto a las dos anteriores.

Puesto que las tres especies son capaces de crecer entre 4°C y 30°C y presentan esquemas diferentes en la expresión de proteínas a estas temperaturas se eligen estos dos puntos de temperatura para realizar los siguientes experimentos.

2. Niveles de expresión de las chaperonas GroEL, DnaK y sus chaperoninas GroES y DnaJ en las especies estudiadas en función de la temperatura.

Con el objetivo de comprobar si la adaptación térmica está mediada por las proteínas chaperonas GroEL, GroES, DnaK y DnaJ se estudiaron los niveles relativos de expresión de los genes de *groEL*, *groES*, *dnaK* y *dnaJ* en las dos especies de *Shewanella* que ocupan esta tesis mediante la técnica de RT-PCR. Además, se estudiaron también los niveles de las proteínas correspondientes a estos genes mediante la técnica de western-blot o inmunodetección en las tres especies descritas.

2. 1. Cuantificación relativa de la expresión génica de chaperonas en cultivos de 4°C y 30°C en *Shewanella oneidensis* y *Shewanella frigidimarina*.

Para el ensayo de cuantificación relativa de la expresión de los genes diana *groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ* (utilizando como candidatos a genes housekeeping *tpiA* e *infB*) se comprobó previamente la eficiencia de amplificación de los primers diseñados, tal y como se menciona en el apartado 7. 2 de materiales y métodos. Una vez comprobada esta eficiencia como óptima (entre el 95% y el 100%) para el experimento y que no se amplificaban productos inespecíficos se procedió al ensayo de cuantificación relativa de estos genes entre las muestras extraídas de los cultivos de 4°C y 30°C.

El ensayo se realizó en las especie mesófila *S. oneidensis* y en la psicotolerante *S. frigidimarina*, ambas del género *Shewanella*.

Resultados

Para las dos especies los genes ensayados como candidatos a *housekeeping* o normalizadores endógenos no fueron finalmente válidos para este objetivo ya que su expresión resultó variar notablemente entre las dos condiciones de temperatura (no mostrado). Por este motivo, y puesto que partimos de la misma cantidad de µg de ARN en cada caso, la normalización de la expresión se realizó utilizando únicamente como gen normalizador para controlar las posibles variaciones debidas a la eficiencia de la reacción de retrotranscripción y errores de pipeteo el *spike* pTri-xef que se introdujo como ARNm exógeno antes de la síntesis del ADNc y cuya cantidad se mantiene constante tanto en las muestras de 4°C como en las de 30°C.

2.1.1. Análisis de expresión génica diferencial entre los grupos de muestras de 4°C y 30°C según el método del ΔC_t .

Como partimos de la misma cantidad de ARNm y hemos comprobado la adecuada eficiencia de la reacción de retrotranscripción utilizando el ARNm exógeno de pTri-xef y, además, la eficiencia de amplificación de los cebadores es prácticamente del 100% obtenemos las ratios o cambios de *folding* de las muestras de 30°C con respecto a 4°C a partir de la comparación de los valores de C_t de los genes estudiados y aplicando la fórmula: $\text{Ratio (30°C/4°C)} = 2^{C_t(4°C) - C_t(30°C)}$. La ratio representa el número de veces que se expresa más el gen diana en la muestra de 30°C frente a la expresión de este mismo gen a 4°C, temperatura considerada como condición control o calibradora.

En la tabla R2 se muestran los valores de las ratios (RQ) calculadas para *S. oneidensis* representados en la figura R6. Los valores obtenidos no indican sobre expresión de los genes de las chaperonas GroEL, GroES, DnaK y DnaJ en las muestras de 30°C con respecto a las de 4°C.

Tabla R2. Ratios calculadas para los genes *groEL*, *groES*, *dnaK* y *dnaJ* entre las muestras de 4°C y 30°C de la especie *Shewanella oneidensis*.

	<i>groEL</i>	<i>groES</i>	<i>dnaK</i>	<i>dnaJ</i>
RQ (30/4)	0,50	1,17	1,87	0,63
SD	0,20	0,35	0,56	0,36

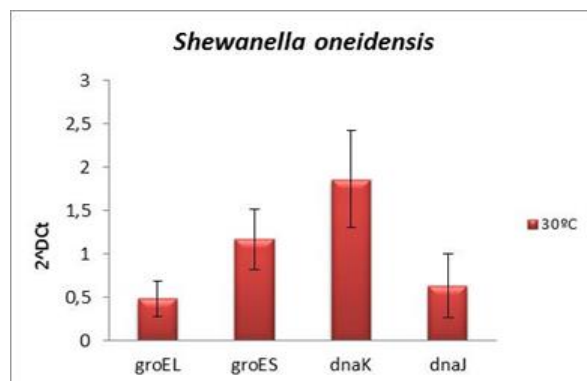


Figura R6. Representación de las ratios obtenidas de los genes *groEL*, *groES*, *dnaK* y *dnaJ* entre las muestras de 4°C y 30°C de la especie *S. oneidensis* en la fase final del crecimiento. El eje de ordenadas representa el incremento de expresión del gen diana en las muestras de 30°C sobre las de 4°C.

En la tabla R3 y la figura R7 se observan los datos relativos a *S. frigidimarina* y su representación gráfica. Aunque la tendencia es mayor, tampoco hay una clara sobre expresión de ninguno de los genes ensayados en las muestras de 30°C sobre las de 4°C.

Tabla R3. Ratios calculadas para los genes *groEL*, *groES*, *dnaK* y *dnaJ* entre las muestras de 4°C y 30°C de la especie *S. frigidimarina*.

	<i>groEL</i>	<i>groES</i>	<i>dnaK</i>	<i>dnaJ</i>
RQ (30/4)	1,72	1,36	1,65	0,65
SD	0,61	0,39	0,46	0,14

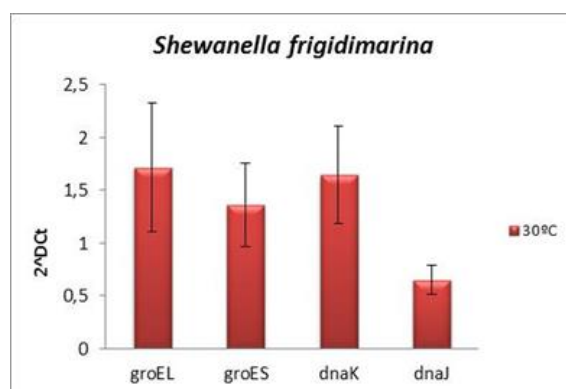


Figura R7. Representación de las ratios obtenidas de los genes *groEL*, *groES*, *dnaK* y *dnaJ* entre las muestras de 4°C y 30°C de la especie *S. frigidimarina* en la fase final del crecimiento. El eje de ordenadas representa el incremento de expresión del gen diana en las muestras de 30°C sobre las de 4°C.

Resultados

Las diferencias estadísticas entre los grupos de muestras de 4°C y 30°C se calcularon mediante el test-T. La significación estadística se calculó mediante el test -T y el post test no paramétrico Mann Whitney con el programa GraphPad Prisma 4.0. Este estadístico está recomendado para la comparación de grupos con un numero de muestras bajo ($n \sim 20$) y además no requiere que los valores a analizar se ajusten a una distribución normal. No se hallaron diferencias significativas. Se considera sobre expresión de un gen sobre otro cuando la ratio entre ambos es mayor de 2 y represión en el caso en que la ratio está por debajo de 0,5. Estos límites indican diferencia de, al menos, un ciclo de amplificación.

2. 2. Inmunodetección de Hsps mediante western-blot.

El western-blot a partir de los extractos de proteína total reveló diferencias en los niveles de expresión de algunas proteínas Hsp entre los cultivos a 4°C y los incubados a 30°C de las tres especies de estudio.

La especie mesófila, *S. oneidensis*, cuyo óptimo de temperatura de crecimiento se sitúa en 30°C expresa, en los cultivos a esta misma temperatura, elevados niveles de las chaperonas GroEL/GroES y DnaK (Figura R8), proteínas sintetizadas bajo situaciones de estrés, entre otras, encargadas del correcto plegamiento de otras proteínas y de prevenir la formación de agregados entre proteínas desnaturalizadas.

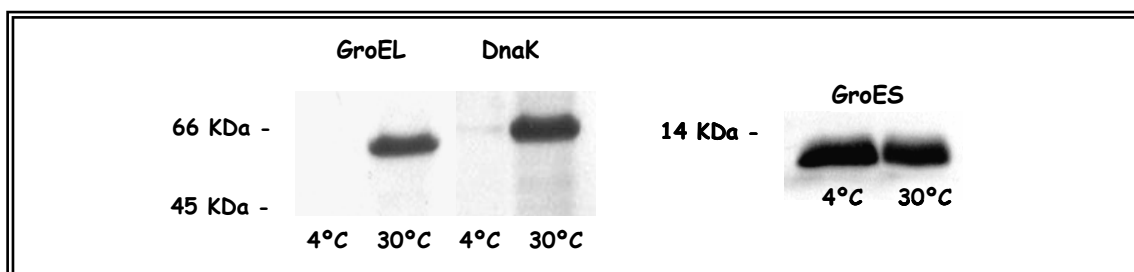


Figura R8. Inmunodetección con anticuerpos específicos de las chaperonas GroEL, GroES y DnaK en los cultivos a 4°C y 30°C de *Shewanella oneidensis*. El estándar de pesos está indicado a la izquierda de las imágenes.

Los resultados de la inmunodetección a 4°C muestran, sin embargo, una ligera expresión de DnaK, niveles no detectables de GroEL y una fuerte señal de GroES.

La sobre expresión de las chaperonas estudiadas en los cultivos crecidos a 30°C indica que, a pesar de estar alejada de su óptimo de crecimiento descrito el desarrollo a 4°C supone una situación más favorable para esta especie mesófila desde el punto de vista del estrés molecular.

Según estos resultados esta especie mesófila parece crecer de manera más favorable a bajas temperaturas, alejadas de su óptimo descrito, que a temperaturas más cálidas, situación en la que observamos la elevación de los niveles de proteínas de respuesta a estrés.

Aunque la chaperonina GroES suele actuar de manera conjunta con la chaperona GroEL en el plegamiento de proteínas que han perdido su conformación no se ha detectado, en nuestros ensayos, expresión observable de esta última a 4°C a pesar de la intensa señal de GroES.

En la inmunodetección de las mismas chaperonas en el caso de los cultivos de *S. frigidimarina*, especie psicrotolerante con una temperatura de crecimiento óptimo de 20°C, encontramos expresión de proteínas de respuesta a estrés (figura R9) en los cultivos crecidos a una temperatura 10°C por encima de ésta. En los cultivos de 4°C, temperatura muy por debajo de su punto óptimo pero similar a la propia del ambiente de donde fue aislada, la especie señalada no expresa este tipo de proteínas o, al menos, sus niveles no son detectables mediante la técnica empleada.

En esta ocasión el sistema de chaperonas que se expresa completo a 30°C es el formado por la chaperona DnaK de la familia Hsp70 y su co-chaperona DnaJ de la familia Hsp40. No se detectaron niveles de la cochaperonina GroES a pesar de que sí se consiguió una buena detección de su acompañante GroEL (figura R9).

Resultados

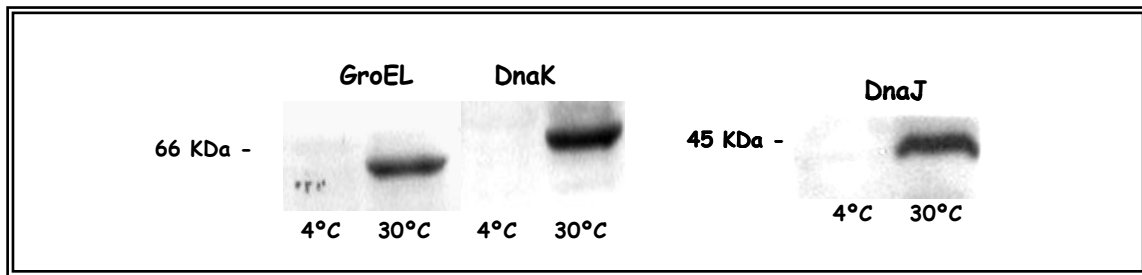


Figura R9. Inmunodetección con anticuerpos específicos de las chaperonas GroEL, DnaK y DnaJ en los cultivos a 4°C y 30°C de *Shewanella frigidimarina*. El estándar de pesos está indicado a la izquierda de las imágenes.

Del mismo modo que ocurre en las especies anteriores en el caso de *P. frigidicola* también encontramos niveles detectables de las chaperonas GroEL y DnaK cuando se cultiva a 30°C pero no cuando crece a 4°C (figura R10). Para este psicrófilo, cuya temperatura óptima de crecimiento es de, aproximadamente, 15°C desarrollarse bajo condiciones de temperatura 15°C por encima de su óptimo parece suponer una situación de estrés que podría intentar combatir con la elevación de los niveles de chaperonas que hagan frente a las consecuencias de dicho estrés.

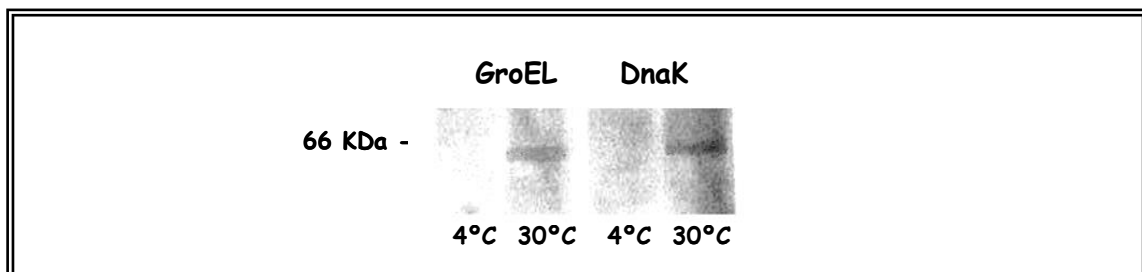


Figura R10. Inmunodetección con anticuerpos específicos de las chaperonas GroEL, y DnaK en los cultivos a 4°C y 30°C de *Psychrobacter frigidicola*. El estándar de pesos está indicado a la izquierda de las imágenes.

3. Diferencias en el proteoma total en dos condiciones de temperatura alejadas.

Mediante los experimentos de 2D-DIGE se llevó a cabo la comparación del proteoma total a 4°C y 30°C de las tres especies estudiadas con el objetivo de ver en cada una de ellas las diferencias de expresión más significativas en cada temperatura ensayada.

3. 1. Análisis de electroforesis bidimensional diferencial de *Shewanella oneidensis* a 4°C y 30°C.

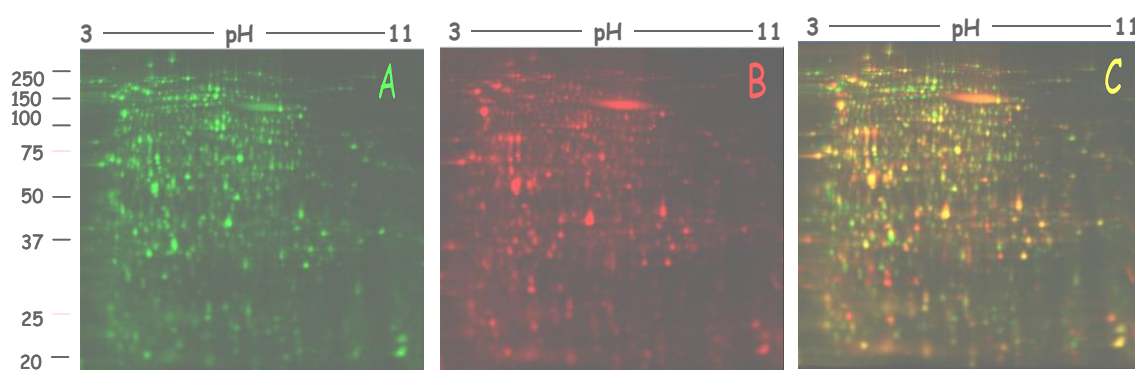


Figura R. 11. Imágenes de los geles bidimensionales fluorescentes para la comparación por 2D-DIGE de los extractos proteicos totales de *Shewanella oneidensis* cultivada a 4°C y 30°C. Se emplearon tiras de IPG (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare) de pH 3-11 no lineal de 24 cm y un marcador de pesos moleculares mostrado a la izquierda. La imagen A muestra el gel con las muestras de 4°C marcadas con el fluorocromo Cy3 y la imagen B muestra el marcaje de las muestras de 30°C con el fluorocromo Cy5. La imagen C muestra la superposición de las dos imágenes anteriores, observando las diferencias en los niveles de expresión de las manchas proteicas aparecidas en esta imagen como resultado de excitar ambos fluorocromos a la vez.

Del emparejamiento de las imágenes y el análisis estadístico para la normalización de los resultados comparando las condiciones de 4°C y 30°C se determinaron las manchas proteicas de mayor interés como candidatas a ser identificadas. Se consideraron estadísticamente significativos los cambios en la abundancia del ratio de ± 2 veces de la comparación entre 4°C/30°C y con un t-test de $p < 0.01$, determinándose así 395 manchas. Se seleccionaron las 54 manchas de mayor cambio en dicha ratio para ser recortadas del gel, digeridas con tripsina e identificadas por

Resultados

espectrometría de masas MALDI-TOF o MALDI-TOF-TOF y mediante el motor de búsqueda MASCOT™.

De las 54 manchas seleccionadas (figura R12) y recortadas se identificaron 47 que correspondieron a 47 proteínas y 7 no pudieron identificarse (tabla R4).

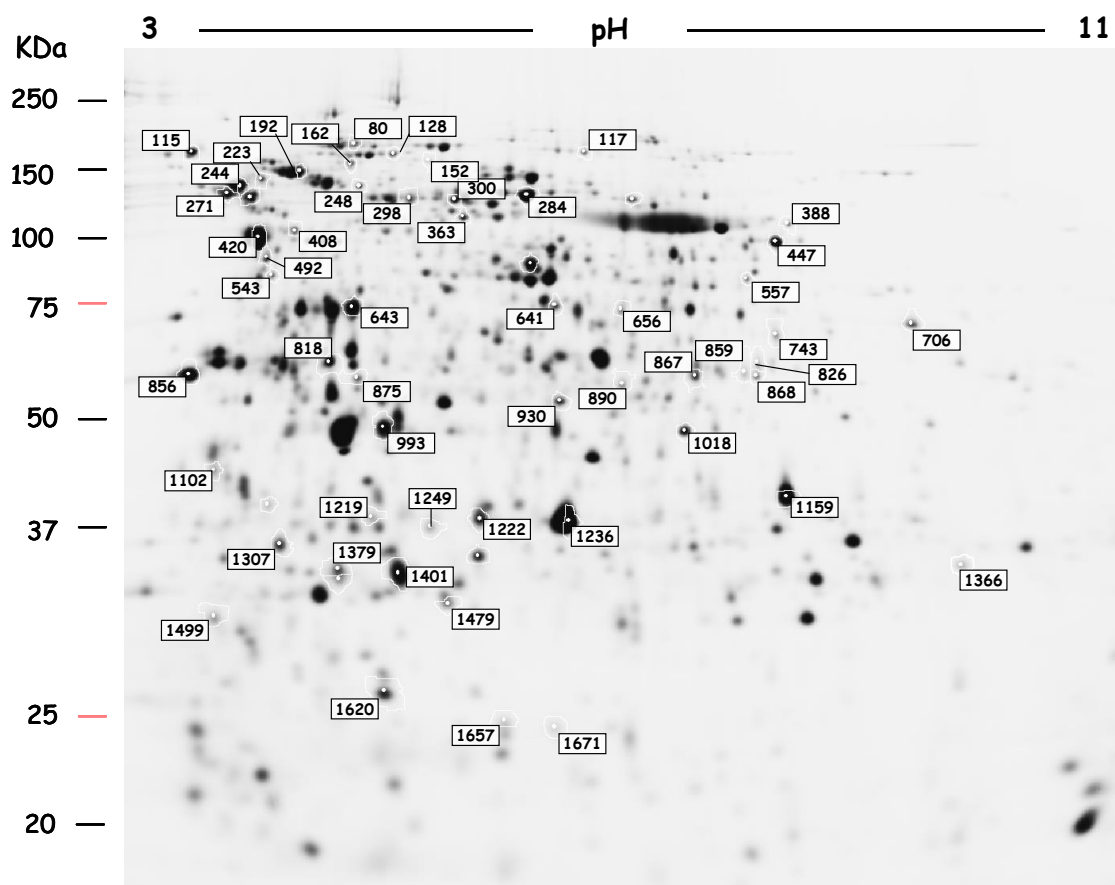


Figura R12. Imagen representativa de un gel 2D-DIGE del extracto proteico total de *S. oneidensis* sobre el que aparecen etiquetadas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis comparativo de los extractos a 4°C y 30°C, que fueron recortadas del gel, tripsinizadas e identificadas mediante espectrometría de masas.

En la tabla R4 se detallan las identificaciones de proteínas de *S. oneidensis* correspondientes a las manchas recortadas del gel (figura R12) y los parámetros de la identificación en MASCOT™.

Tabla R4. Identificación de proteínas sobre expresadas en *S. oneidensis* a 4°C y 30°C.

mancha	Ratio 4/30	Proteína identificada	Especie	Score	Nºpept	Cód. Acc.	% SC	pI	M.M. (Da)	Gr. Funcional	R*
743	3,36	Acetate kinase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	224	26	NP_718485	71%	6.60	39407	M. Energético	
875	8,23	Oxidoreductase, FMN-binding	<i>S. oneidensis</i> MR-1	189	26	NP_718946	58%	5.23	36629	M. Redox	
50	2,45	Phosphoenolpyruvate carboxykinase PckA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	350	33	NP_715804	75%	5.56	56190	M. Carbohid.	
128	2,61	Aconitate hydratase AcnB	<i>S. oneidensis</i> MR-1	284	34	NP_716069	40%	5.27	94879	M. Carbohid.	
298	7,6	Formate C-acetyltransferase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	143	24	NP_718482	24%	5.55	85205	M. Carbohid.	
867	9,4	2-methylcitrate synthase PrpC	<i>S. oneidensis</i> MR-1	281	15	NP_715984	38%	6.17	58982	M. Carbohid.	
300	7,65	periplasmic C-terminal processing protease Prc	<i>S. oneidensis</i> MR-1	225	30	NP_718187	39%	5.57	76395	M. Prot.	
408	3	Aculeacin A acylase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	95	28	NP_716547	30%	5.01	92593	M. Prot.	
284	16,35	Dipeptidyl peptidase S46 family	<i>S. oneidensis</i> MR-1	376	52	NP_716702	66%	5.85	68876	M. Prot.	
117	20,94	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) GcvP	<i>S. oneidensis</i> MR-1	216	15	NP_716412	17%	5.70	105348	M. Amin.	
363	23,85	Prolyl oligopeptidase family protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	111	14	NP_719779	20%	5.49	73874	M. Amin.	
248	2,96	Peptidase, putative	<i>S. oneidensis</i> MR-1	182	15	NP_717820	19%	5.28	77948	M. Amin.	
868	5,82	Gamma-glutamyltransferase GgtB	<i>S. oneidensis</i> MR-1	131	11	NP_716372	14%	6.11	39090	M. Amin.	
706	3,21	TolB protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	146	21	NP_718332	44%	8.89	43897	Transp./Memb.	
115	12,7	TonB-dependent receptor domain-containing protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	200	17	NP_718479	25%	4.54	95930	Transp./Memb.	
271	2,52	Ferric alcaligin siderophore receptor	<i>S. oneidensis</i> MR-1	273	31	NP_718601	52%	4.74	80853	Transp./Memb.	
543	2,31	Agglutination protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	225	26	NP_719845	51%	5.17	52368	Transp./Memb.	
1671	2,44	Ferric uptake regulator	<i>S. oneidensis</i> MR-1	176	8	NP_717544	33%	5.77	16504	Estrés/chap.	
1499	5,59	Ferritin	<i>S. oneidensis</i> MR-1	128	11	NP_715781	23%	4.77	20362	Estrés/chap.	
388	4,55	Hypothetical protein SO_3361	<i>S. oneidensis</i> MR-1	175	31	NP_718915	46%	6.62	69137	Hipotética	
1249	3,17	Hypothetical protein SO_3184	<i>S. oneidensis</i> MR-1	120	10	NP_718740	28%	5.35	27787	Hipotética	
162	3,24	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	<i>S. oneidensis</i> MR-1	223	31	NP_717689	39%	5.14	87147	Replic./Trad.	
223	23,02	Elongation factor G	<i>S. oneidensis</i> MR-1	169	15	NP_716473	22%	4.91	77127	Replic./Trad.	
656	4,86	Siderophore biosynthesis protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	191	11	NP_718598	21%	6.27	48427	Replic./Trad.	
1307	4,93	Ribose-5-phosphate isomerase A	<i>S. oneidensis</i> MR-1	108	12	NP_716775	51%	5.03	23354	Replic./Trad.	
1366	2,07	cAMP-regulatory protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	86	4	NP_716257	19%	7.12	23862	Replic./Trad.	
1102	18,69	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
1219	6,45	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
826	3,27	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
859	6,73	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
1401	2,65	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
1379	-3,04	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>Shewanella sp.</i> MR-4	250	10	YP_734504	37%	5.01	22085	M. Redox	
1479	-4,27	Anti-oxidant AhpCTSA family protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	115	12	NP_718895	58%	5.76	22153	M. Redox	
80	-4,91	2-methyl citrate dehydratase Fe-S dependent AcnD	<i>S. oneidensis</i> MR-1	349	41	NP_715983	46%	5.15	93904	M. Carbohid.	
890	-2,38	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	148	14	NP_717935	27%	5.83	28657	M. Carbohid.	
641	-2,42	Periplasmic serine protease DegQ	<i>S. oneidensis</i> MR-1	151	19	NP_719473	46%	5.95	46522	M. Prot.	
818	-2,57	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	205	22	NP_717569	52%	5.12	39874	M. Amin.	
492	-10,82	Periplasmic amidohydrolase 3 family protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	116	18	NP_716619	31%	5.03	62282	M. Amin.	
1657	-2,16	Nucleoside diphosphate kinase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	451	13	NP_717870	66%	5.50	15530	M. Nucl.	
557	-35,13	Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	200	15	YP_962758	30%	6.36	51929	M. Nucl.	
856	-2,64	Outer membrane porin, putative	<i>S. oneidensis</i> MR-1	353	30	NP_719427	69%	4.70	39874	Transp./Memb.	
993	-4,65	Flagellin	<i>S. oneidensis</i> MR-1	210	23	NP_718793	62%	7.93	33512	Transp./Memb.	
930	-2,62	Iron(III) ABC transporter	<i>S. oneidensis</i> MR-1	270	28	NP_716375	67%	6.02	37394	Transp./Memb.	
1236	-4,95	Hypothetical protein SO_4719	<i>S. oneidensis</i> MR-1	329	32	NP_720235	79%	6.46	29348	Transp./Memb.	
152	-16,79	ClpB protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	185	19	NP_719122	23%	5.36	95759	Estrés/chap.	
244	-6,8	Chaperone protein DnaK	<i>S. oneidensis</i> MR-1	291	40	NP_716751	60%	4.77	77298	Estrés/chap.	
420	-2,74	Chaperonin GroEL	<i>S. oneidensis</i> MR-1	354	35	NP_716337	69%	4.84	57101	Estrés/chap.	
1620	-39,67	Universal stress protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	276	11	NP_719222	54%	5.26	15642	Estrés/chap.	
447	-2,28	Hypothetical protein SO_A0100	<i>S. oneidensis</i> MR-1	345	34	NP_720428	62%	6.84	65670	Hipotética	
1018	-4,83	Hypothetical protein SO_0456	<i>S. oneidensis</i> MR-1	215	14	NP_716093	31%	7.79	43542	Hipotética	
1159	-3,51	Hypothetical protein SO_2583	<i>S. oneidensis</i> MR-1	134	17	NP_718169	61%	7.75	29576	Hipotética	
643	-19,8	Elongation factor Tu	<i>S. oneidensis</i> MR-1	306	31	NP_715857	79%	5.13	56562	Replic./Trad.	
1222	-3,19	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
192	-4,45	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	

Score: Puntuación asignada por MASCOT™

Nº pept: Número de péptidos coincidentes.

Cod. Acc.: Código de acceso de la proteína en la base de datos de NCBI. ** En UniProtKB Database.

%SC: Porcentaje de secuencia cubierta.

pI: Punto isoeléctrico.

M.M. (Da): Masa molecular en Daltons.

Grupo: Grupo funcional asignado.

R*: Representación del ratio 4/30 en código de colores que hace referencia al logaritmo en base 10 del valor de la ratio obtenido. El color rojo indica sobre expresión a 30°C y el verde sobre expresión a 4°C. La mayor intensidad de color indica una mayor sobreexpresión.

Resultados

Clasificación funcional de las proteínas identificadas en *Shewanella oneidensis*

Para un mejor manejo de los resultados y una visión más sencilla de los mismos se clasificaron las proteínas identificadas en los siguientes grupos según su función (figura R13): Metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nucleótidos, metabolismo de proteínas, metabolismo energético, metabolismo redox, transporte y transmembranales, chaperonas y proteínas de respuesta a estrés, replicación y traducción, hipotéticas. Además se añadió un grupo de no identificadas para aquellas manchas de las que no se obtuvo identificación en MASCOT™.

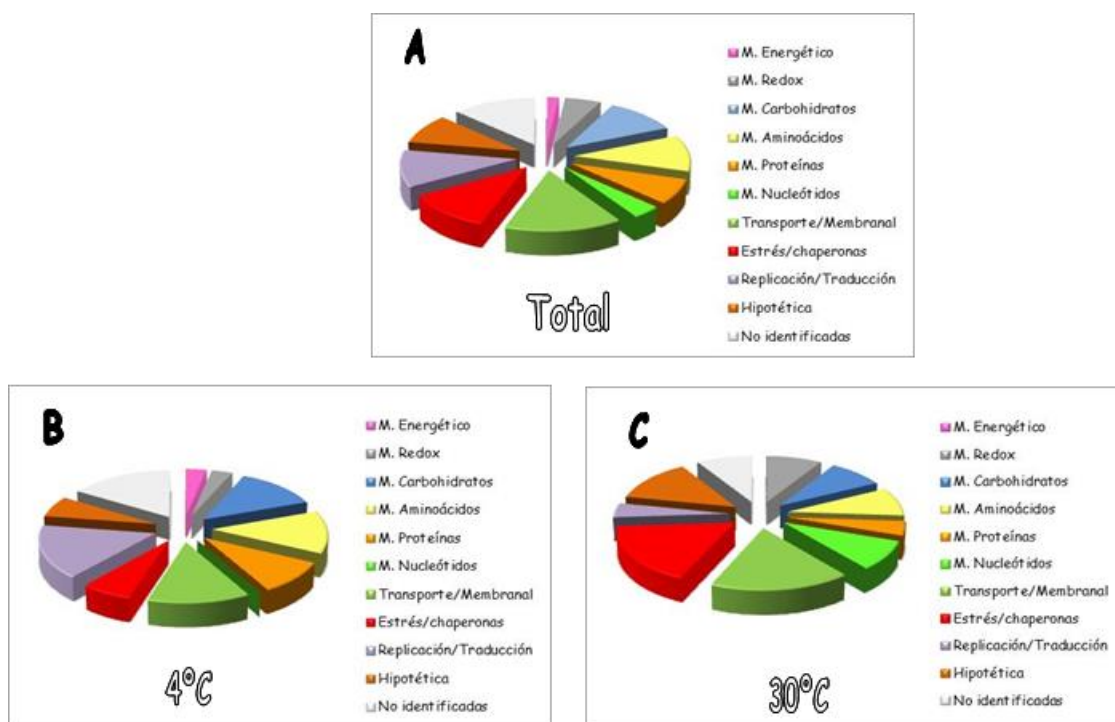


Figura R13. Representación gráfica de la clasificación de proteínas por su funcionalidad de las manchas proteicas identificadas en *Shewanella oneidensis*. Las categorías establecidas son: Metabolismo energético (M. Energético), Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción, hipotéticas y por último un grupo de manchas no identificadas. El gráfico A muestra la clasificación del total de manchas proteicas identificadas. El gráfico B muestra la clasificación de las proteínas identificadas cuya expresión aparece aumentada a 4°C y el gráfico C el de aquellas aumentadas a 30°C.

Las tablas R5-R14 agrupan a las proteínas identificadas en los geles del experimento de 2D-DIGE tanto en las muestras de cultivos a 4°C como a 30°C de *S. oneidensis* según su función con una breve descripción de ésta.

Tabla R5: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Metabolismo Energético" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Acetate kinase	Cataliza la reacción de acetato a acetyl fosfato mediante la hidrólisis de ATP involucrándose en la activación de la acetyl-CoA y secreción de acetato

Tabla R6: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Metabolismo Redox" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Alkyl hydroperoxide reductase	Enzima que confiere protección antioxidante por su acción reductasa tiol-dependiente de peróxidos
Anti-oxidant AhpCTSA family protein	Función antioxidante
Oxidoreductase, FMN-binding	Procesos de oxidorreducción utilizando NADPH como agente reductor y flavinmononucleótidos como cofactor

Tabla R7: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Carbohidratos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Phosphoenolpyruvate carboxykinase PckA	Enzima gluconeogénica que cataliza el primer paso en la desviación de los intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico hacia la gluconeogénesis
2-Methyl citrate dehydratase Fe-S dependent AcnD	Involucrada en el metabolismo energético como parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; cataliza la formación de cis-acnitato a partir de citrato
Aconitate hydratase AcnB	Cataliza la isomerización reversible de citrato e isocitrato como parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Formate acetyltransferase	Esta enzima convierte formiato + acetyl-CoA en piruvato + CoA
2-Methylcitrate synthase PrpC	Cataliza la síntesis de 2-methylcitrate desde el propionil-CoA y oxalacetato. Y la condensación de oxalacetato con acetyl-CoA con baja especificidad
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Participa en los procesos de glicolisis y glucogenogénesis mediante la interconversión de 1,3-difosfoglicerato y gliceraldehído-3-fosfato

Resultados

Tabla R8: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Aminoácidos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Glycine dehydrogenase	Forma parte del sistema multienzimático de escisión de glicina mediante descarboxilación
Prolyl oligopeptidase family protein	Interviene en el transporte y metabolismo de los aminoácidos mediante la actividad dipeptidil aminopeptidasa
Peptidase, putative	Dipeptidilaminopeptidasa implicada en el transporte y metabolismo de aminoácidos
4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Oxida el hidroxifenilpiruvato a homogentisato que sufre oxidación no enzimática y polimerización en pigmentos marrones protectores de la luz
Gamma-glutamyltranspeptidase GgtB	Participa en la degradación de glutamina y glutatión extracelular proporcionando a la célula precursores de aminoácidos esenciales y tiene actividad glutamiltransferasa
Urease domain-containing protein	Se le atribuye una función amidohidrolasa metalo-dependiente que hidroliza la urea provocando un aumento de pH

Tabla R9: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Proteínas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Carboxy-terminal protease	Interviene en el proceso postraduccional de proteínas, maduración y degradación. Posee un sitio de reconocimiento C-terminal del sustrato
Aculeacin A acylase	Cataliza la hidrólisis de enlaces amida de proteínas y pequeñas moléculas
Dipeptidyl peptidase S46 family	Actividad serin-peptidasa. Se localiza en la superficie celular
Periplasmic serine protease DegQ	Proteasa y chaperona. Protección térmica y frente a otras situaciones de estrés. La función chaperona es dominante a bajas temperaturas mientras que la función proteolítica se activa a elevadas temperaturas

Tabla R10: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Nucleótidos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Nucleoside diphosphate kinase	Forma nucleósidos trifosfatos a partir de la unión de un ATP a un nucleósido difosfato
inositol-5-monophosphate dehydrogenase	Enzima esencial que cataliza la primera etapa única de síntesis de GTP, jugando un papel clave en la regulación de la proliferación y diferenciación celular

Tabla R11: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Transporte/Membranales" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
TolB protein	Proteína periplásmica de membrana celular que forma parte del sistema Tol interaccionando con la proteína TolA y el peptidoglicano participa en la integridad celular. También interacciona con determinadas porinas
TonB-dependent receptor domain-containing protein	Controla la apertura del canal membranal cuando el ligando está unido. Forma parte del sistema de captación de hierro
Ferric alcaligin siderophore receptor	Receptor de membrana externa que transporta iones férricos, perteneciente a la familia de receptores TonB
Agglutination protein	Perteneciente a la subfamilia TolC se cree que participa en la secreción interna de proteínas así como en el transporte externo de pequeñas moléculas
Outer membrane porin, putative	Formación de canales acuosos para la difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa.
Flagellin	Proteína estructural que por polimerización forma parte del flagelo bacteriano
Iron(III) ABC transporter, periplasmic iron(III)-binding protein	Unión y transporte de hierro (III) extracelular
Hypothetical protein SO_4719	De la superfamilia de proteínas periplásmicas de unión a ligando tipo 2 (PPB2). Une específicamente su ligando activando a otro transportador de membrana similar que transloca hacia el interior al ligando para regular la transcripción

Tabla R12: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Estrés/Chaperonas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
clpB protein	Recuperación celular frente a un estrés térmico. Actúa en un multisistema de chaperonas, e interviene previamente a DnaK hidrolizando los agregados de proteínas contribuyendo a su solubilización y replegamiento
Chaperone protein DnaK	Encargada del replegamiento de proteínas y eliminación de agregados
Chaperonin GroEL	Promueve el replegamiento de polipéptidos mal plegados especialmente bajo situaciones de estrés
Universal stress protein	Eleva la tasa celular durante una exposición larga a agentes estresantes
Ferric uptake regulator	Posible implicación en el metabolismo energético, en la regulación transcripcional como represor y frente al estrés oxidativo
Ferritin	Almacén de hierro: absorbe hierro reducido y lo oxida para su utilización

Resultados

Tabla R13: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Hipotéticas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Hypothetical protein SO_3361	Potencialmente membranal de función desconocida
Hypothetical protein SO_A0100	Supuesta función hidrolasa metalo-dependiente con plegamiento en toneles triosafosfato isomerasa.
Hypothetical protein SO_0456//immunogenic-related protein	Hipotético sistema de transporte no caracterizado periplásmico tripartito no dependiente de ATP
Hypothetical protein SO_2583	Función sólo predictiva metiltransferasa
Hypothetical protein SO_3184	Actividad transferasa

Tabla R14: Proteínas identificadas en *S. oneidensis* agrupadas en la categoría "Replicación/Traducción" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	Entre otras, función de unión del anticodon del ARNt y dirige al fenilalanin-ARNt al sitio activo de la enzima
Elongation factor G	Involucrado en las fases de elongación y reciclaje en el ribosoma durante la síntesis de proteínas
Siderophore biosynthesis protein	Actividad oxidorreductasa, dependiente de NADPH, en el proceso de biosíntesis de los sideróforos
Ribose-5-phosphate isomerase A	Cataliza la conversión reversible de ribosa-5-fosfato a ribulosa-5-fosfato en la vía no oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato
cAMP-regulatory protein	Regula la transcripción mediante la unión de AMPc a sitios cercanos a promotores de operones que se activan por la unión de un catabolito
Elongation factor Tu	Promueve la unión GTP dependiente del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma durante la síntesis de proteínas

3. 2. Análisis de electroforesis bidimensional diferencial de *Shewanella frigidimarina*.

Observamos las diferencias en los niveles de expresión de la imagen resultante de excitar ambos fluorocromos a la vez (figura R14).

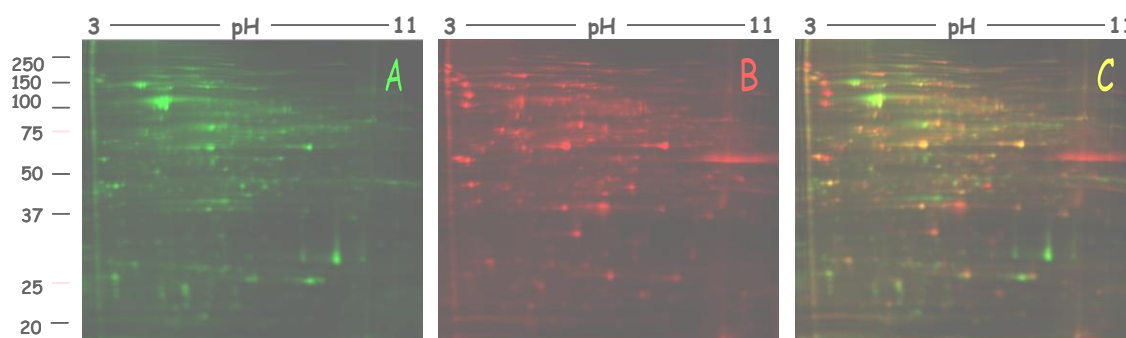


Figura R14. Imágenes de los geles bidimensionales fluorescentes para la comparación por 2D-DIGE de los extractos proteicos totales de *Shewanella frigidimarina* cultivada a 4°C y 30°C. Se emplearon tiras de IPG (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare) de pH 3-11 no lineal de 24 cm y un marcador de pesos moleculares mostrado a la izquierda. La imagen A muestra el gel con las muestras de 4°C marcadas con el fluorocromo Cy3 y la imagen B muestra el marcaje de las muestras de 30°C con el fluorocromo Cy5. La imagen C muestra la superposición de las dos imágenes anteriores, observando las diferencias en los niveles de expresión de las manchas proteicas aparecidas en esta imagen como resultado de excitar ambos fluorocromos a la vez.

Del emparejamiento de las imágenes y el análisis estadístico para la normalización de los resultados comparando las condiciones de 4°C y 30°C se determinaron las manchas proteicas de mayor interés como candidatas a ser identificadas. Se consideraron estadísticamente significativos los cambios en la abundancia del ratio de +/- 1,5 veces de la comparación entre 4°C/30°C y con un t-test de $p < 0,005$, determinándose así 128 manchas.

De las 53 manchas recortadas (figura R15) se identificaron 48 que correspondieron a 32 proteínas (con varias isoformas) y 5 sin identificación satisfactoria (tabla R15).

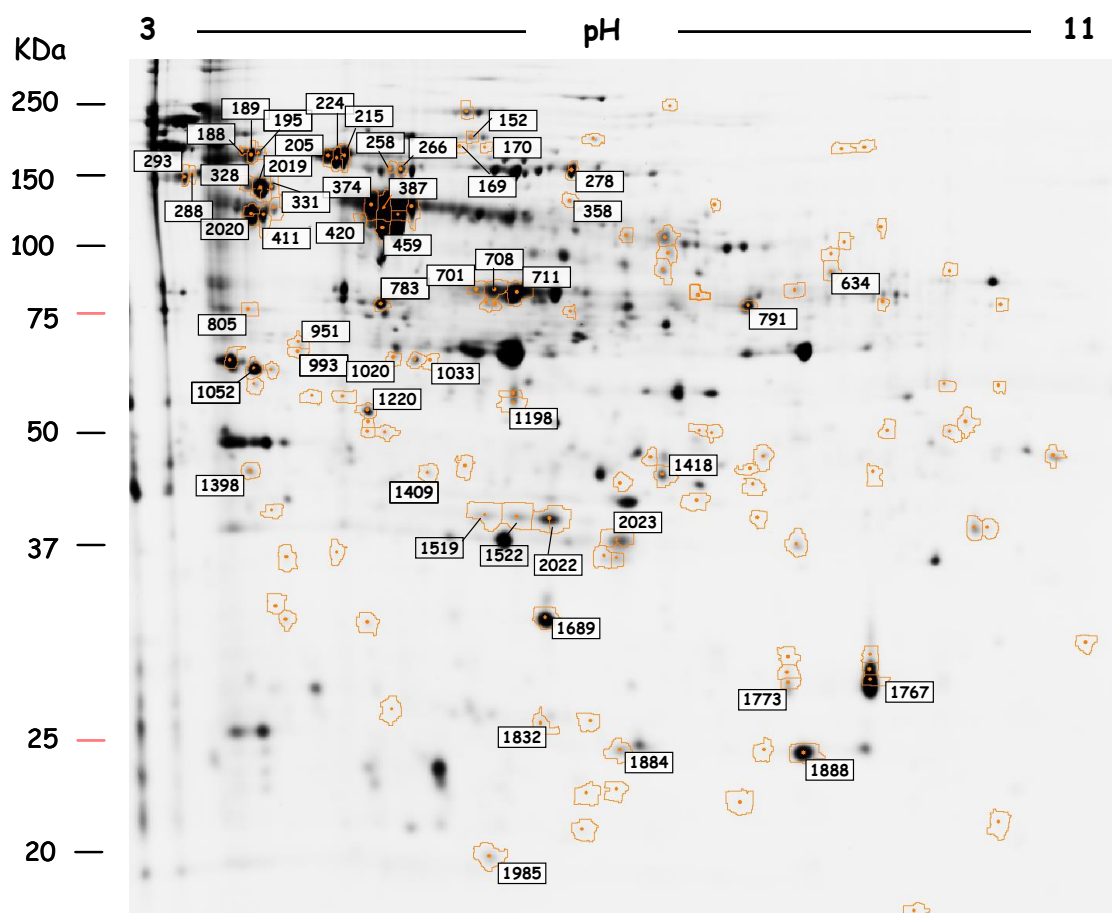


Figura R15. Imagen representativa de un gel 2D-DIGE del extracto proteico total de *Shewanella frigidimarina* sobre el que aparecen etiquetadas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis comparativo de los extractos a 4°C y 30°C, que fueron recortadas del gel, tripsinizadas e identificadas mediante espectrometría de masas.

En la tabla R15 se detallan las identificaciones de proteínas de *S. frigidimarina* correspondientes a las manchas recortadas del gel (figura R15) y los parámetros de la identificación en MASCOT™.

Tabla R15. Identificación de proteínas sobre expresadas en *S. frigidimarina* a 4°C y 30°C.

Mancha	Ratio 4/30	Proteína identificada	Especie	Score	Nº pépt	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo	R*
634	3,73	Glutathione reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	171	10	YP_752541	21%	5,55	48293	M. Redox	
2023	12,75	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	137	7	YP_750145	34%	5,22	22198	M. Redox	
1602	38,07	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	103	12	YP_750145	68%	5,22	22198	M. Redox	
993	18,01	Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	74	10	YP_749230	32%	4,46	35885	M. Carbohid.	
951	10,2	Agmatine deiminase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	89	11	YP_750304	39%	4,61	41039	M. Amin.	
2020	65,17	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	212	30	YP_751223	49%	4,32	67244	M. Nuc/Amin.	
411	23,24	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	225	31	YP_751223	49%	4,32	67244	M. Nuc/Amin.	
2019	142,81	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	212	27	YP_751222	53%	4,50	56299	M. Nuc/Amin.	
331	32,23	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	131	8	YP_751222	15%	4,50	56299	M. Nuc/Amin.	
328	45	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	176	11	YP_751222	18%	4,50	56299	M. Nuc/Amin.	
1052	114,95	Porin	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	124	18	YP_749202	47%	4,53	34011	Transp./Memb.	
783	8,48	Outer membrane channel protein	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	153	20	YP_752007	43%	4,97	47015	Transp./Memb.	
195	10,63	TonB-dependent siderophore receptor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	187	23	YP_752515	32%	4,55	78903	Transp./Memb.	
189	7,15	TonB-dependent siderophore receptor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	120	10	YP_752515	15%	4,55	78903	Transp./Memb.	
188	5,61	TonB-dependent siderophore receptor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	153	20	YP_752515	26%	4,55	78903	Transp./Memb.	
1689	24,66	Hypothetical protein Sfri_2875	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	139	13	YP_751553	52%	5,92	20372	Hipotética	
358	9,57	Peptidase M61 domain-containing protein	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	144	12	YP_751451	14%	5,33	68235	Hipotética	
278	16,91	Hypothetical protein Sfri_0573	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	158	21	YP_749272	31%	5,57	80465	Hipotética	
293	7,71	Hypothetical protein Sfri_2225	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	141	22	YP_750909	36%	4,40	75029	Hipotética	
1033	2,8	---								No identif.	
1020	2,78	---								No identif.	
288	5,7	---								No identif.	
2022	-11,34	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	319	13	YP_750145	41%	5,22	22198	M. Redox	
1522	-5,94	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	222	9	YP_750145	34%	5,22	22198	M. Redox	
1519	-7,17	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	223	11	YP_750145	41%	5,22	22198	M. Redox	
1985	-6,78	ChainA, Solution Structure Of A Tetrahaem Cytochrome	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	89	4	2K3V_A*	53%	4,61	9310	M. Redox	
791	-4,06	Protease Do	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	92	14	YP_752037	41%	5,87	47095	M. Proteínas	
1409	-5,37	Stationary-phase survival protein SurE	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	98	9	YP_749748	34%	5,00	26351	M. Nucl.	
1832	-3,34	Nucleoside diphosphate kinase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	101	8	NDK_SHEFN**	38%	5,38	15477	M. Nucl.	
805	-3,49	Flagellar hook-associated protein FlgL	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	141	18	YP_749862	32%	4,35	42352	Transp./Memb.	
1888	-26	Co-chaperonin GroES	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	120	10	YP_752327	100%	5,81	10153	Estrés/chap.	
1418	-2,92	Phage shock protein A, PspA	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	137	13	YP_751257	49%	5,42	25743	Estrés/chap.	
1398	-8,24	GrpE protein	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	138	7	YP_751470	19%	4,43	22235	Estrés/chap.	
420	-4,8	Trigger factor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	72	7	YP_751276	24%	4,73	47835	Estrés/chap.	
387	-9,15	Chaperonin GroEL	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	177	26	YP_752326	51%	4,83	57115	Estrés/chap.	
374	-9,3	Chaperonin GroEL	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	139	4	YP_752326	6%	4,83	57115	Estrés/chap.	
224	-6,16	Chaperone protein DnaK	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	143	18	YP_749660	43%	4,70	68893	Estrés/chap.	
215	-6,17	Chaperone protein DnaK	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	123	17	YP_749660	42%	4,70	68893	Estrés/chap.	
205	-6,95	Chaperone protein DnaK	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	207	14	YP_749660	21%	4,70	68893	Estrés/chap.	
1773	-24,2	Ferritin, Dps family protein	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	196	5	YP_750527	23%	5,78	17684	Estrés/chap.	
1767	-27,15	Ferritin, Dps family protein	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	172	18	YP_750527	73%	5,78	17684	Estrés/chap.	
1884	-5,89	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	87	11	YP_750939	64%	5,08	11852	Estrés/chap.	
1198	-6,16	Elongation factor Ts	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	92	11	YP_749962	40%	5,12	30304	Replic./Trad.	
711	-3,18	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	248	28	YP_748847	72%	5,07	43547	Replic./Trad.	
708	-4,13	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	183	20	YP_748847	63%	5,07	43547	Replic./Trad.	
701	-5,81	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	94	14	YP_748847	39%	5,07	43547	Replic./Trad.	
459	-7,54	tRNA modification GTPase TrmE	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	77	9	YP_752726	30%	4,84	49300	Replic./Trad.	
266	-6,49	30S ribosomal protein S1	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	82	10	YP_750807	24%	4,88	61260	Replic./Trad.	
258	-9,09	30S ribosomal protein S1	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	95	10	YP_750807	30%	4,88	61260	Replic./Trad.	
152	-4,24	Elongation factor G	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	148	5	YP_749249	6%	4,95	77026	Replic./Trad.	
1220	-5,41	Hypothetical protein Sfri_0844	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	182	10	YP_749535	35%	4,88	33161	Hipotética	
169	-5,03	---								No identif.	
170	-4,45	---								No identif.	

Score: Puntuación asignada por MASCOT™

Nº pept: Número de péptidos coincidentes.

Cod. Acc.: Código de acceso de la proteína en la base de datos de NCBI. ** En UniProtKB Database.

%SC: Porcentaje de secuencia cubierta.

pI: Punto isoeléctrico.

M.M. (Da): Masa molecular en Daltons.

Grupo: Grupo funcional asignado.

R*: Representación del ratio 4/30 en código de colores que hace referencia al logaritmo en base 10 del valor de la ratio obtenido. El color rojo indica sobre expresión a 30°C y el verde sobre expresión a 4°C. La mayor intensidad de color indica una mayor sobreexpresión.

Resultados

Se observa un mayor número de proteínas identificadas que ven aumentada su expresión a 30°C. De estas, la gran mayoría pertenecen a los grupos de chaperonas y proteínas de estrés (GroES, Trigger factor, PspA, Clps adaptor, GrpE, GroEL y DnaK) y de replicación y traducción (especialmente factores de elongación y proteínas ribosomales). Sin embargo, estos dos grupos funcionales no aparecen representados en el caso de las muestras de 4°C, donde principalmente se identifican proteínas de transporte y de membrana, además de un importante número de isoformas de la proteína alcalina fosfatasa, involucrada en el metabolismo de nucleótidos y aminoácidos.

Cabe destacar que en las muestras de 30°C el metabolismo redox está representado sobre todo por la aparición de tres isoformas de la proteína alquil hidroperóxido reductasa. Y que otras dos isoformas de esta misma proteína aparecen, también, en los cultivos a 4°C.

En general, tanto en los cultivos a 4°C como en los incubados a 30°C, y a diferencia de lo que se observa en *S. oneidensis* y *P. frigidicola*, en *S. frigidimarina* aparece un elevado número de isoformas de diversas proteínas (receptor dependiente de TonB, alquil hidroperóxido reductasa, alcalina fosfatasa, GroEL, DnaK, ferritina, factor de elongación Tu y proteína S1 30S ribosomal) de, prácticamente, todos los grupos funcionales establecidos.

Clasificación funcional de las proteínas identificadas en *Shewanella frigidimarina*

Se realizó una clasificación de las proteínas identificadas del mismo modo que para la especie *S. oneidensis*.

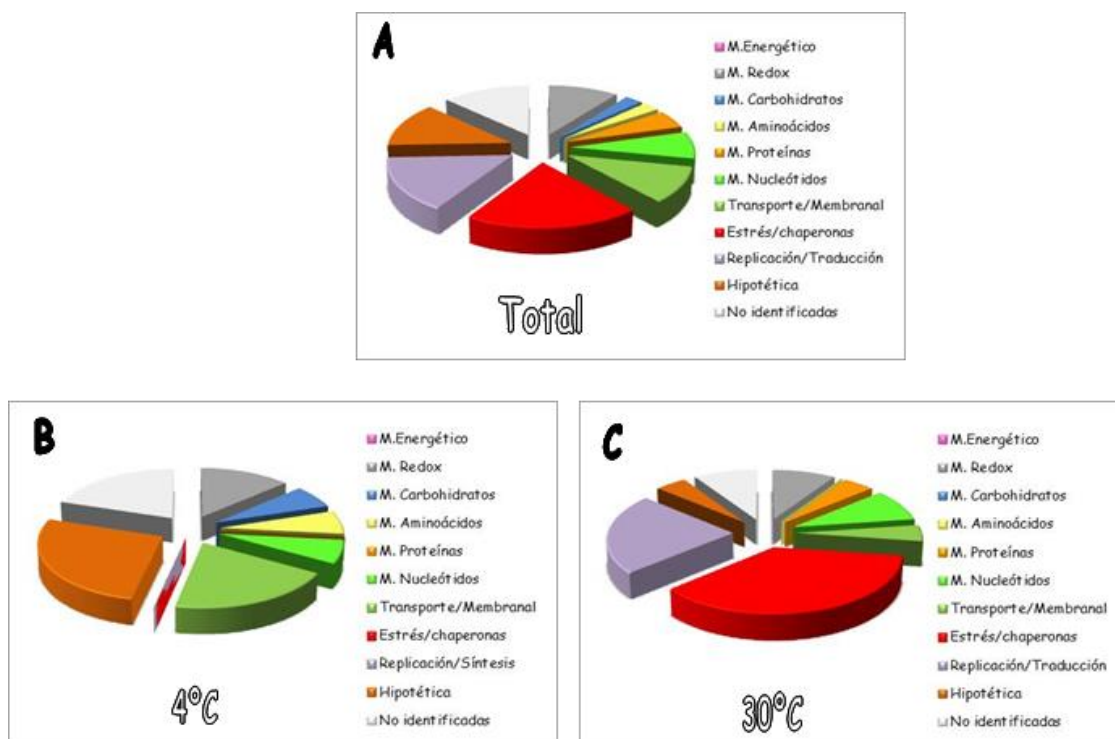


Figura R16. Representación gráfica de la clasificación de proteínas por su funcionalidad de las manchas proteicas identificadas en *Shewanella frigidimarina*. Las categorías establecidas son: Metabolismo energético (M. Energético), Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción, hipotéticas y por último un grupo de manchas no identificadas. El gráfico A muestra la clasificación del total de manchas proteicas identificadas. El gráfico B muestra la clasificación de las proteínas identificadas cuya expresión aparece aumentada a 4°C y el gráfico C el de aquellas aumentadas a 30°C.

Las tablas R16-R23 agrupan a las proteínas identificadas en los geles del experimento de 2D-DIGE tanto en las muestras de cultivos a 4°C como a 30°C de *S. frigidimarina* según su función con una breve descripción de ésta.

Resultados

Tabla R16 : Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Metabolismo Redox" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Alkyl hydroperoxide reductase	Confiere protección antioxidante por su acción reductasa tiol-dependiente de peróxidos
Glutathione reductase	Regulación redox y defensa oxidativa: cataliza la reducción de glutatión manteniendo los niveles elevados de este glutatión reducido en el citosol
Chain A, Solution Structure Of A Tetrahaem Cytochrome	Función estructural del citocromo tetrahemo tipo-c envuelto en la reducción del hierro durante la respiración anaerobia

Tabla R17: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Carbohidratos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Fructose-1,6-bisphosphatase	Cataliza la hidrólisis de fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato siendo crítica en la vía de la gluconeogénesis

Tabla R18: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Aminoácidos" y una breve descripción de su función. *También en metabolismo de nucleótidos.

Proteína	Función
Agmatine deiminase	Cataliza la formación de carbamoylputrescina a partir de agmatina en la vía de la arginina descarboxilasa en la biosíntesis de putrescina. Indica descomposición de aminoácidos
Alkaline phosphatase*	Defosforilación de nucleótidos y proteínas. Cataliza una reacción de hidrólisis para producir fosfato inorgánico y el correspondiente alcohol.

Tabla R19: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* a grupadas en la categoría "Metabolismo de Nucleótidos" y una breve descripción de su función. *También en metabolismo de aminoácidos.

Proteína	Función
Stationary-phase survival protein SurE	Nucleotidasa/polifosfatasa. Cataliza la conversión de un fosfato monoéster a un alcohol y un fosfato
Alkaline phosphatase*	Defosforilación de nucleótidos y proteínas. Cataliza una reacción de hidrólisis para producir fosfato inorgánico y el correspondiente alcohol
Nucleoside diphosphate kinase	Síntesis de nucleósidos trifosfato usando magnesio como cofactor

Tabla R20: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Transporte/Membranales" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Porin	Difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana
Flagellar hook-associated protein FlgL	Proteína estructural que sirve de unión para el anclaje del filamento flagelar a la membrana
Outer membrane channel protein	Implicada en el flujo de transporte de moléculas hidrofóbicas desde el interior membranar al exterior celular
TonB-dependent siderophore receptor	Transporte activo transmembranar de sideróforos como el hierro

Tabla R21: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Estrés/Chaperonas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Co-chaperonin GroES	Mantenimiento de la fuerza protón-motriz en situaciones de estrés como choque térmico o fallos en la exportación de proteínas
Phage shock protein A, PspA	Factor de intercambio de adenina de la chaperona DnaK en el proceso de replegamiento de proteínas
GrpE protein	Actúa como una chaperona manteniendo a las proteínas que se están sintetizando en su conformación abierta para ser plegadas
Trigger factor	Promueve el correcto plegamiento de polipéptidos mal plegados especialmente bajo condiciones de estrés
Chaperonin GroEL	Promueve el replegamiento de polipéptidos mal plegados especialmente bajo situaciones de estrés
Chaperone protein DnaK	Encargada del replegamiento de proteínas y eliminación de agregados
Ferritin, Dps family protein	Proteína de unión a hierro implicada en la resistencia al estrés oxidativo y en la protección durante la falta de nutrientes.
ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	Modula la acción proteolítica de degradación de agregados de proteínas por parte del sistema ClpAP

Resultados

Tabla R22: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Replicación/Traducción" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Elongation factor Ts	Intercambia un nucleótido de guanina en el complejo GDP-EF-Tu posibilitando al EF-Tu la unión y adición de un aminocil-ARNt en la síntesis de proteínas.
Elongation factor Tu	Promueve la unión GTP dependiente del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma durante la síntesis de proteínas.
tRNA Modification GTPase TrmE	Involucrada en la biosíntesis del nucleósido hipermodificado 5-metilaminometil-2-tiouridina que se une a algunos ARNt y que afecta al corrimiento de marco del ribosoma.
30S Ribosomal protein S1	Reconocimiento y unión de ARNm durante el inicio de la traducción.
Elongation factor G	Promueve la translocación GTP-dependiente del ribosoma durante la traducción.

Tabla R23: Proteínas identificadas en *S. frigidimarina* agrupadas en la categoría "Hipotéticas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Hypothetical protein Sfri_2875	Su estructura sugiere una implicación en el metabolismo, transporte y/o almacenaje de quinonas
Hypothetical protein Sfri_0844	Función desconocida
Peptidase M61 domain- containing protein	Función peptidasa sólo predictiva
Hypothetical protein Sfri_0573	Función desconocida
Hypothetical protein Sfri_2225	Función desconocida

3. 3. Análisis de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) de *Psychrobacter frigidicola* a 4°C y 30°C.

Observamos las diferencias en los niveles de expresión de la imagen resultante de excitar ambos fluorocromos (Cy3 y Cy5) a la vez.

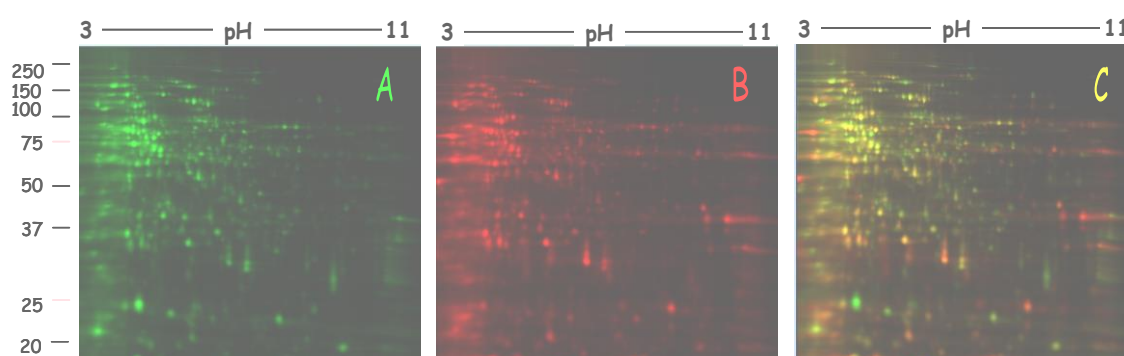


Figura R17. Imágenes de los geles bidimensionales fluorescentes para la comparación por 2D-DIGE de los extractos proteicos totales de *Psychrobacter frigidicola* cultivada a 4°C y 30°C. Se emplearon tiras de IPG (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare) de pH 3-11 no lineal de 24 cm y un marcador de pesos moleculares mostrado a la izquierda. La imagen A muestra el gel con las muestras de 4°C marcadas con el fluorocromo Cy3 y la imagen B muestra el marcaje de las muestras de 30°C con el fluorocromo Cy5. La imagen C muestra la superposición de las dos imágenes anteriores, observando las diferencias en los niveles de expresión de las manchas proteicas aparecidas en esta imagen como resultado de excitar ambos fluorocromos a la vez.

Del emparejamiento de las imágenes y el análisis estadístico para la normalización de los resultados comparando las condiciones de 4°C y 30°C se determinaron las manchas proteicas de mayor interés como candidatas a ser identificadas. Para ello, se consideraron estadísticamente significativos los cambios en la abundancia del ratio de $\pm 2,5$ veces de la comparación entre 4°C/30°C y con un t-test de $p < 0,05$ determinándose así 86 manchas.

Resultados

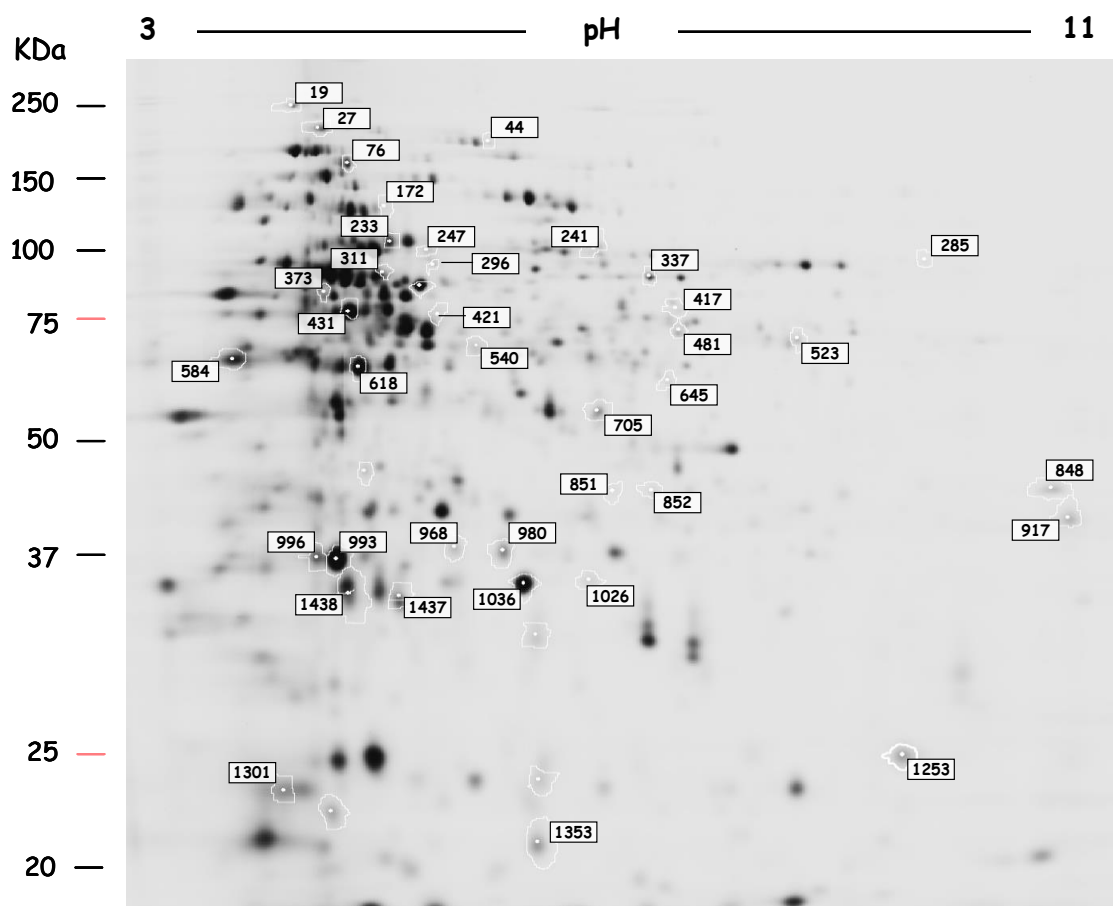


Figura R18. Imagen representativa de un gel 2D-DIGE del extracto proteico total de *Psychrobacter frigidicola* sobre el que aparecen etiquetadas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis comparativo de los extractos a 4°C y 30°C, que fueron recortadas del gel, tripsinizadas e identificadas mediante espectrometría de masas.

De las 44 manchas recortadas (figura R18) se identificaron 39 (tabla R25) que correspondieron a 38 proteínas y de 5 no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Esta se trata de una especie no secuenciada por lo que para la identificación de las manchas se utilizaron las especies filogenéticamente más cercanas como *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychrobacter articus* o el género *Psychrobacter* en otros casos.

En la tabla R25 se detallan las proteínas identificadas, y sus parámetros, correspondientes a las manchas del gel (figura R18) de las muestras de cultivos de *P. frigidicola* a 4°C y 30°C.

Tabla R24. Identificación de proteínas sobre expresadas en *P. frigidicola* a 4°C y 30°C

Mancha	Ratio 4/30	Proteína identificada	Especie	Score	Nºpept	Cód. Acc	% SC	pI	M.M. (Da)	Grupo	R*
44	2,88	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	<i>P. cryohalolentis</i> K5	160	24	YP_579379	24%	5.37	108303	M. Carbohid.	
373	2,79	Argininosuccinate synthase	<i>P. arcticus</i> 273-4	93	11	YP_264913	34%	5.03	46225	M. Amin.	
421	3,36	Gamma-glutamyl kinase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	101	11	YP_580943	39%	5.32	42831	M. Amin.	
311	3,05	Glutamine synthetase, type I	<i>P. cryohalolentis</i> K5	86	10	YP_580703	21%	5.12	52236	M. Amin.	
296	4,29	Hypothetical protein Pcryo_1549	<i>P. cryohalolentis</i> K5	142	10	YP_580810	16%	5.23	62796	M. Amin.	
19	3,39	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	208	8	YP_579476	5%	4.78	147464	M. Nucl.	
27	3,34	Carbamoyl-phosphate synthase, large subunit	<i>P. cryohalolentis</i> K5	179	24	YP_580096	24%	4.98	123217	M. Nucl.	
247	4,46	CTP synthetase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	82	10	YP_581136	20%	5.21	60615	M. Nucl.	
481	8,62	Acyl-CoA dehydrogenase-like	<i>P. cryohalolentis</i> K5	138	8	YP_580450	24%	5.88	46876	M. Nucl.	
417	14,94	Putative nicotinate phosphoribosyltransferase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	111	16	YP_581466	35%	5.90	51410	M. Nucl.	
540	4,61	Phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	<i>P. cryohalolentis</i> K5	222	17	YP_581560	30%	5.39	39695	Replic./Trad.	
431	3,73	Elongation factor Tu	<i>P. cryohalolentis</i> K5	235	23	YP_579692	74%	5.04	43277	Replic./Trad.	
172	3,98	GTP-binding protein TypA	<i>P. cryohalolentis</i> K5	83	5	YP_579640	12%	5.08	67942	Replic./Trad.	
241	3,04	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
1289	-3,79	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	<i>Psychrobacter</i> sp. (Pcrwf-1)	114	5	YP_001280580	59%	5.59	13504	M. Redox	
645	-4,66	Uroporphyrinogen decarboxylase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	151	12	YP_580942	30%	6.01	42217	M. Redox	
1036	-5,53	Hypothetical protein Pcryo_1545	<i>P. cryohalolentis</i> K5	100	12	YP_580808	49%	5.48	22806	M. Redox	
980	-4,16	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	163	10	YP_580820	15%	5.44	22154	M. Redox	
233	-2,76	Leucyl aminopeptidase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	137	18	YP_579319	38%	5.20	60490	M. Amin.	
705	-2,55	Branched-chain amino acid aminotransferase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	115	14	YP_580441	44%	5.71	34743	M. Amin.	
1253	-14,56	Endoribonuclease L-PSP	<i>P. cryohalolentis</i> K5	137	12	YP_579518	61%	8.89	18648	M. Amin.	
618	-3,29	Aminotransferase, class V	<i>P. cryohalolentis</i> K5	197	21	YP_579458	66%	5.13	41591	M. Amin.	
523	-10,75	Peptidase M20D, amidohydrolase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	95	13	YP_580523	33%	6.74	46763	M. Amin.	
337	-4,9	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>P. arcticus</i> 273-4	180	25	YP_264642	52%	5.99	52630	M. Nucl.	
852	-3,29	Inositol-1(or 4)-monophosphatase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	190	8	YP_579514	18%	6.07	30665	Transp./Memb.	
584	-7,05	Porin	<i>P. cryohalolentis</i> K5	104	15	YP_581138	45%	4.61	38871	Transp./Memb.	
359	-2,53	Trigger factor	<i>P. frigidicola</i>	103	9	B6RI53**	19%	4.54	50600	Estrés/chap.	
1081	-4,61	Protein GrpE	<i>Psychrobacter</i> sp. G	151	8	YP_008164497	35%	4.64	22674	Estrés/chap.	
1326	-3,37	GroES	<i>P. arcticus</i> 273-4	139	6	YP_263847	54%	4.95	10351	Estrés/chap.	
993	-2,88	Superoxide dismutase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	139	13	YP_581492	63%	5.05	23649	Estrés/chap.	
996	-3,19	Superoxide dismutase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	202	9	YP_581492	24%	5.05	23649	Estrés/chap.	
1301	-3,7	Thioredoxin	<i>P. arcticus</i> 273-4	210	7	YP_265270	32%	4.78	11993	Estrés/chap.	
1126	-6,77	Ferritin, Dps family protein	<i>Psychrobacter</i> sp. (Pcrwf-1)	132	7	YP_001280432	75%	5.06	17870	Estrés/chap.	
1438	-3,85	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	<i>P. cryohalolentis</i> K5	296	18	YP_579931	68%	5.02	18696	Estrés/chap.	
76	-4,48	ATPase AAA-2	<i>P. cryohalolentis</i> K5	140	20	YP_580108	31%	5.07	96035	Estrés/chap.	
1437	-2,96	Ribosome recycling factor	<i>P. cryohalolentis</i> K5	156	11	YP_580974	35%	5.27	20846	Replic./Trad.	
1353	-4,9	Transcriptional coactivator/pterin dehydratase	<i>P. cryohalolentis</i> K5	109	6	YP_580814	30%	5.48	12736	Replic./Trad.	
816	-3,42	Elongation factor Ts	<i>P. arcticus</i> 273-4	160	9	YP_263654	35%	4.95	31766	Replic./Trad.	
848	-8,83	Hypothetical protein Pcryo_0423	<i>P. cryohalolentis</i> K5	182	8	YP_579690	25%	8.59	31941	Hipotética	
917	-9,25	Hypothetical protein Pcryo_1438	<i>P. cryohalolentis</i> K5	205	8	YP_580701	29%	9.08	28594	Hipotética	
285	-3,22	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
851	-4,36	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
968	-3,46	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	
1026	-3,74	---	---	---	---	---	---	---	---	No identif.	

Score: Puntuación asignada por MASCOT™

Nº pept: Número de péptidos coincidentes.

Cód. Acc.: Código de acceso de la proteína en la base de datos de NCBI. ** En UniProtKB Database.

%SC: Porcentaje de secuencia cubierta.

pI: Punto isoeléctrico.

M.M. (Da): Masa molecular en Daltons.

Grupo: Grupo funcional asignado.

R*: Representación del ratio 4/30 en código de colores que hace referencia al logaritmo en base 10 del valor de la ratio obtenido. El color rojo indica sobre expresión a 30°C y el verde sobre expresión a 4°C. La mayor intensidad de color indica una mayor sobreexpresión.

En esta especie encontramos la mayor diferencia en cuanto número de manchas proteicas identificadas que ven aumentada su expresión en 30°C con respecto a 4°C.

Resultados

Del mismo modo, el principal grupo representado a 30°C, y que no hemos encontrado a 4°C, es el correspondiente a chaperonas y proteínas de estrés (trigger factor, GrpE, GroES, superóxido dismutasa, tioredoxina, ferritina, peptidil-prolil isomerasa y la ATPasa AAA-2). También a 30°C encontramos diferentes proteínas involucradas en el metabolismo redox mientras que no han aparecido en el tratamiento de 4°C.

Clasificación funcional de las proteínas identificadas en *Psychrobacter frigidicola*

Se clasificaron bajo el mismo criterio y grupos funcionales definidos para las dos especies anteriores las proteínas identificadas en este caso.

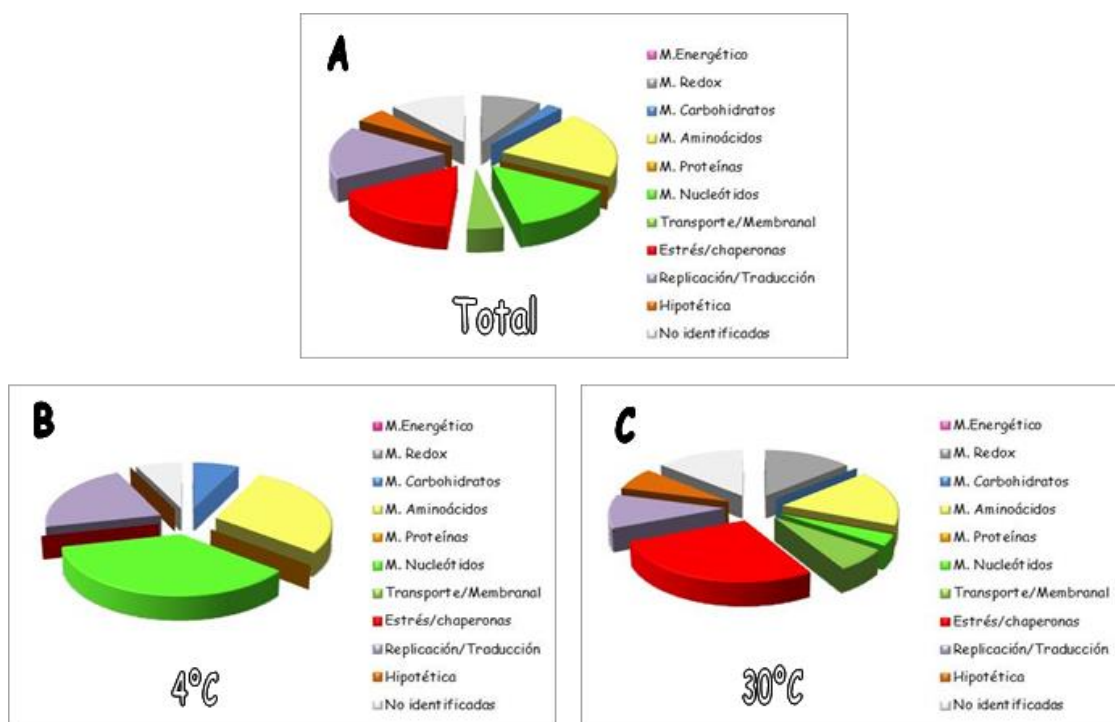


Figura R19. Representación gráfica de la clasificación de proteínas por su funcionalidad de las manchas proteicas identificadas en *Psychrobacter frigidicola*. Las categorías establecidas son: Metabolismo energético (M. Energético), Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción, hipotéticas y por último un grupo de manchas no identificadas. El gráfico A muestra la clasificación del total de manchas proteicas identificadas. El gráfico B muestra la clasificación de las proteínas identificadas cuya expresión aparece aumentada a 4°C y el gráfico C el de aquellas aumentadas a 30°C.

Las tablas R25-R32 agrupan a las proteínas identificadas en los geles del experimento de 2D-DIGE tanto en las muestras de cultivos a 4°C como a 30°C de *P. frigidicola* según su función con una breve descripción de ésta.

Tabla R25: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Metabolismo Redox" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
NADH-quinone oxidoreductase subunit K	Posee función oxidorreductasa utilizando como mediadores en el transporte de electrones flavin mononucleótidos y centros ferrosulfurosos.
Uroporphyrinogen decarboxylase	Cataliza una reacción de descarboxilación en el ciclo de biosíntesis del tetrapirrol del grupo hemo.
Ferritin, Dps family protein	Proteína de unión a hierro implicada en la resistencia al estrés oxidativo y en la protección durante la falta de nutrientes.
Hypothetical protein Pcryo_1545	Implicada en procesos de oxido-reducción
Glyoxalase/bleomycin resistance rotein/dioxygenase	Oxidorreductasa de unión a Fe. Involucrada en el catabolismo de compuestos aromáticos

Tabla R26: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Carbohidratos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 component	Decarboxilación oxidativa del oxoglutarato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Tabla R27: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Aminoácidos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Leucyl aminopeptidase	Participa en la degradación de proteínas catalizando la eliminación de aminoácidos desde el extremo N-terminal
Argininosuccinate synthase	Biosíntesis de arginina a partir de ornitina
Gamma-glutamyl kinase	Participa en el proceso de biosíntesis de prolina catalizando la transferencia de un grupo fosfato para formar a su precursor, el glutamato-5-fosfato
Branched-chain amino acid aminotransferase	Cataliza la transaminación de la leucina, isoleucina y valina
Endoribonuclease L-PSP	Perteneciente a una familia de proteínas implicada en la biosíntesis de aminoácidos como la isoleucina
Glutamine synthetase, type I	Participa en el proceso de biosíntesis de glutamina
Aminotransferase, class V	Serin-piruvato y aspartato aminotransferasas dependiente de piridoxal fosfato
Hypothetical protein Pcryo_1549	Pertenece a la familia de las tiamina pirofosfato (TPP) implicadas en diferentes rutas metabólicas
Peptidase M20D, amidohydrolase	Involucrada en el metabolismo de grupos amido

Resultados

Tabla R28: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Metabolismo de Nucleótidos" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Phosphoribosyl formyl glycine synthase	Participa en la biosíntesis de novo de purina
Carbamoyl-phosphate synthase, large subunit	Proceso de biosíntesis de nucleótidos de pirimidina
CTP synthetase	Biosíntesis de pirimidina, cataliza la formación de CTP a partir de UTP utilizando glutamina o amonio como fuente de energía
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Cataliza el primer paso del proceso de síntesis de novo de nucleótidos de guanina
Acyl-CoA dehydrogenase-like	Oxidoreductasa de la acetil-CoA
Putative nicotinate phosphoribosyltransferase	Biosíntesis de NAD

Tabla R29: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Transporte/Membranal" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Inositol-1(or 4)-monophosphatase	Defosforilación del inositol monofosfato
Porin	Formación de canales acuosos para la difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa

Tabla R30: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Estrés/Chaperonas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Trigger factor	Implicada en la exportación de proteínas que están siendo sintetizadas manteniéndolas en su conformación abierta
Protein GrpE (Hsp-70 cofactor)	Previene la agregación de proteínas desnaturalizadas por estrés hiperosmótico y térmico. Supone un factor de intercambio nucleotídico para DnaK y puede funcionar como un termosensor
GroES	Se une a GroEL en presencia de Mg y ATP y actúa junto a ella en el plegamiento correcto de proteínas
Superoxide dismutase	Hace frente al estrés oxidativo eliminando los radicales superóxido, tóxicos para la célula. Une hierro y manganeso
Thioredoxin	Regula la función de muchas proteínas como enzimas y factores de transcripción y también juega un papel importante como defensa frente al estrés oxidativo
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	Acelera el plegamiento de proteínas por isomerización de enlaces
ATPase AAA-2	Pertenece a la familia ClpB. Chaperona ATP-dependiente que actúa frente a estrés por calor impidiendo la formación de agregados

Tabla R31: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Replicación/Traducción" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	Implicada en la formación del fenilalanil-ARNt en la biosíntesis de proteínas
Ribosome recycling factor	Responsable de la liberación de los ribosomas del ARNm al final de la biosíntesis de proteínas. Aumenta la eficiencia de la traducción
Elongation factor Tu	Unión, dependiente de GTP, del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma durante la biosíntesis de proteínas
GTP-binding protein TypA	Factor de traducción con actividad GTP-asa que se une al ribosoma por el mismo sitio que EF-G
Transcriptional coactivator/pterin dehydratase	Actúa como activador de la transcripción y como enzima metabólica. Cataliza la reacción que da lugar a tirosina a partir de fenilalanina
Elongation factor Ts	Se asocia con el complejo formado por TF-Tu y GDP induciendo el intercambio por GTP

Tabla R32: Proteínas identificadas en *P. frigidicola* agrupadas en la categoría "Hipotéticas" y una breve descripción de su función.

Proteína	Función
Hypothetical protein Pcryo_0423	Función desconocida
Hypothetical protein Pcryo_1438	Función desconocida

Resultados

3. 4. Comparación de la expresión diferencial de las proteínas en común encontradas en las tres especies.

De las proteínas identificadas en al menos dos de las tres especies, y en su caso de las aparecidas en las tres, se realizó un esquema agrupándolas por su categoría funcional establecida y comparando los cambios en la ratio 4/30 en su expresión.

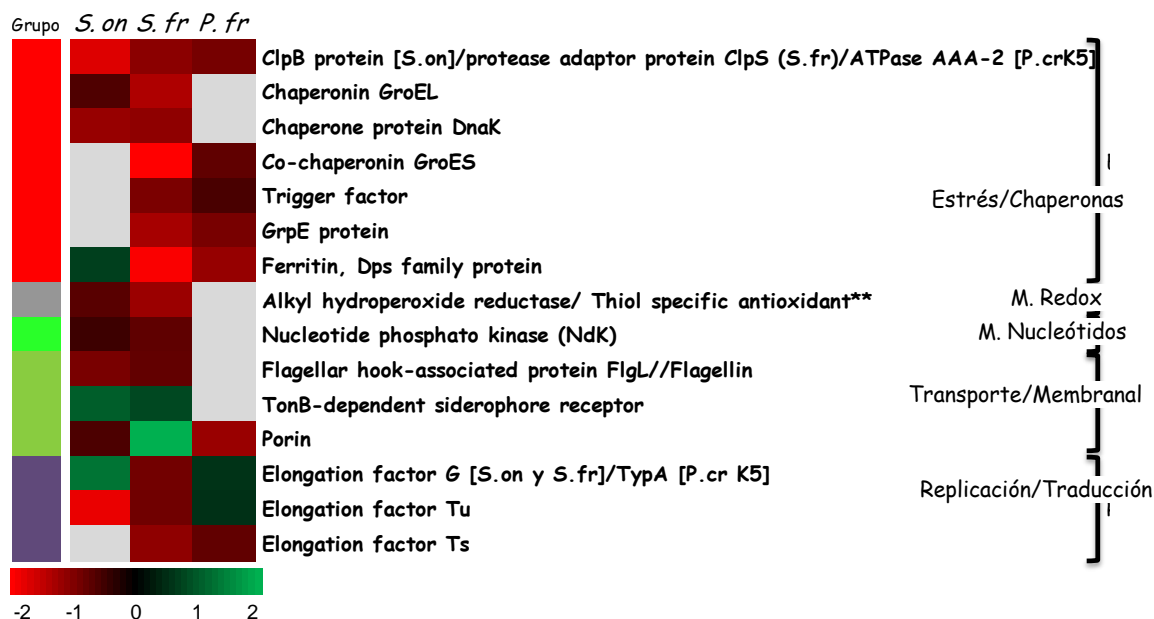


Figura R20. Comparación de los niveles de expresión de las proteínas analizadas por 2D-DIGE e identificadas por espectrometría de masas que aparecen en las tres especies estudiadas o, al menos, en dos de ellas. La primera columna (grupo) indica por código de colores asignado el grupo funcional al que pertenece cada proteína. Las tres columnas siguientes indican el grado de aumento de expresión de la proteína a 4°C (verde) o a 30°C (rojo) según la escala de colores e intensidades mostrada. El color y la intensidad de cada proteína está calculada en función del logaritmo en base 10 del valor de su ratio 4/30 obtenido en el experimento 2D-DIGE, de modo que valores más próximos a -2 indican ratios más altas en proteínas que tienen su expresión aumentada a 30°C y más próximos a 2 ratios mayores en las proteínas que tienen su expresión aumentada a 4°C. El color gris indica la ausencia de identificación de esa proteína en la especie correspondiente. S. on se refiere a la especie *Shewanella oneidensis*, S.fr a *Shewanella frigidimarina* y P. fr a *Psychrobacter frigidicola*.

4. Interacciones de proteínas con las principales chaperonas estudiadas.

4. 1. Proteínas identificadas mediante electroforesis no desnaturante en *Shewanella oneidensis*.

A partir de los extractos proteicos de *S. oneidensis* cultivada a 30°C y 4°C se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturizantes para conservar las uniones entre proteínas que pudieran estar interaccionando y formando complejos macromoleculares (figura R21.A). De este primer gel se recortaron 10 bandas que fueron, después, separadas mediante una electroforesis desnaturizante (figura R21.B). Las bandas aparecidas en este segundo gel se recortaron para ser identificadas por huella peptídica, tripsinizadas, analizadas por espectrometría de masas e identificadas en las bases de datos utilizando el motor de búsqueda MASCOT™.

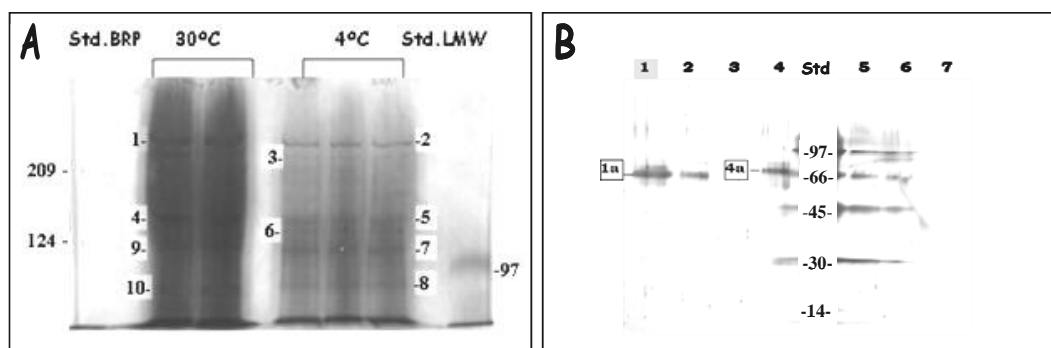


Figura R21. La imagen A corresponde a la electroforesis en condiciones no desnaturizantes de extractos de proteínas de cultivos de *Shewanella oneidensis* incubados a 30°C y 4°C (5,5% de Acrilamida-Bisacrilamida 40%). Los números 1-10 indican las bandas que fueron recortadas, de las que se extrajeron las proteínas inmovilizadas en el gel y que posteriormente se separaron en otra electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, 12% de Acrilamida-Bisacrilamida 40%) cuyo resultado se muestra en la imagen B. Los números que encabezan cada carril de este segundo gel corresponden a las bandas escindidas del gel de la figura A. Las bandas marcadas como 1a y 4a fueron identificadas mediante huella peptídica como chaperonina GroEL y el precursor de la subunidad flavoproteica de la fumarato reductasa, ambas de *Shewanella oneidensis* MR-1, respectivamente. Los estándares de pesos moleculares utilizados fueron el Broad Range Prestained (BPR) de Bio-Rad y LMW.

La banda 1 del gel no desnaturizante, situada por encima de 209 Da (figura R21.A) fue escindida y separada en un gel desnaturizante. El análisis por espectrometría de

Resultados

masas posterior reveló la existencia de la chaperonina GroEL (banda 1a) (~60KDa) que podría estar formando parte de un complejo mayor junto con otras proteínas que actúan en la adaptación térmica ya que, todo esto, parece ocurrir sólo a 30°C.

También se identificó, en los cultivos de 30°C, la proteína precursora de la subunidad flavoproteica de la fumarato reductasa (banda 4a; 62KDa), que actúa como aceptor de electrones y que está implicada en la degradación oxidativa de ácidos grasos, piruvato y aminoácidos.

Con el propósito de resolver y estudiar mejor estos complejos de proteínas se realiza la inmunoprecipitación de los extractos proteicos con anticuerpos específicos para las chaperonas DnaK y GroEL y posterior análisis mediante electroforesis bidimensional.

4. 2. Electroforesis bidimensional de proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos frente a la principales chaperonas GroEL y DnaK en las tres especies de estudio.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de adaptación a la temperatura en las bacterias estudiadas se compararon las proteínas asociadas *in vivo* a DnaK y GroEL. Para ello se realizaron inmunoprecipitaciones de los extractos proteicos a las dos condiciones de temperatura ensayadas con anticuerpos específicos anti-GroEL y anti-Dnak. El resultado de cada inmunoprecipitación a cada temperatura se analizó empleando la electroforesis bidimensional convencional para separar las proteínas que precipitan en conjunto en cada caso y después identificar por espectrometría de masas aquellas manchas aparecidas en el gel.

Se establecieron en este caso las mismas categorías para la clasificación por función de las proteínas identificadas que en el análisis proteómico del extracto total por DIGE de las manchas identificadas por MASCOT™.

4. 2. 1. Identificación de proteínas que interaccionan *in vivo* con GroEL en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en *Shewanella oneidensis*.

Se identifica un menor número de proteínas que interaccionan con GroEL en los extractos inmunoprecipitados de *S. oneidensis* a la temperatura de 4°C (Figura R22 y tabla R33) que a 30°C (Figura R23 y tabla R34) teniendo esta última mayor variabilidad en cuanto a grupos funcionales aparecidos.

Tabla R33. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con GroEL en *S. oneidensis* a 4°C

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
104	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant	<i>S. oneidensis</i> MR-1	132	YP_734504	75%	5,01	22086	M. Redox
109	ArgR-regulated TonB-dependent receptor	<i>S. oneidensis</i> MR-1	170	NP_718017	93%	4,38	92130	Transp./Memb.
110	Outer membrane porin Omp35	<i>S. oneidensis</i> MR-1	248	NP_719427	72%	4,7	39874	Transp./Memb.
111	Nucleoside-specific outer membrane porin OmpK	<i>S. oneidensis</i> MR-1	98	NP_716838	53%	4,71	31430	Transp./Memb.
112	Outer membrane long-chain fatty acid receptor FadL family	<i>S. oneidensis</i> MR-1	123	NP_718661	32%	4,53	47034	Transp./Memb.
103	SodB gene product	<i>S. oneidensis</i> MR-1	64	NP_718453	10%	5,21	21539	Estrés/chap.
105	60 kDa chaperonin	<i>S. oneidensis</i> MR-1	231	Q8CX48	73%	4,84	57101	Estrés/chap.
108	FliB gene product	<i>S. oneidensis</i> MR-1	135	NP_716764	47%	4,45	21855	Estrés/chap.
101	Elongation factor G 2	<i>S. oneidensis</i> MR-1	207	Q8EIJ7	70%	4,91	77127	Replic./Trad.
102	RpsA gene product	<i>S. oneidensis</i> MR-1	155	NP_717992	57%	4,91	61339	Replic./Trad.
106	Elongation factor Tu 2	<i>S. oneidensis</i> MR-1	192	Q8EK70	61%	5,08	43542	Replic./Trad.
107	Elongation factor Ts	<i>S. oneidensis</i> MR-1	80	Q8EGH4	43%	5,31	30509	Replic./Trad.

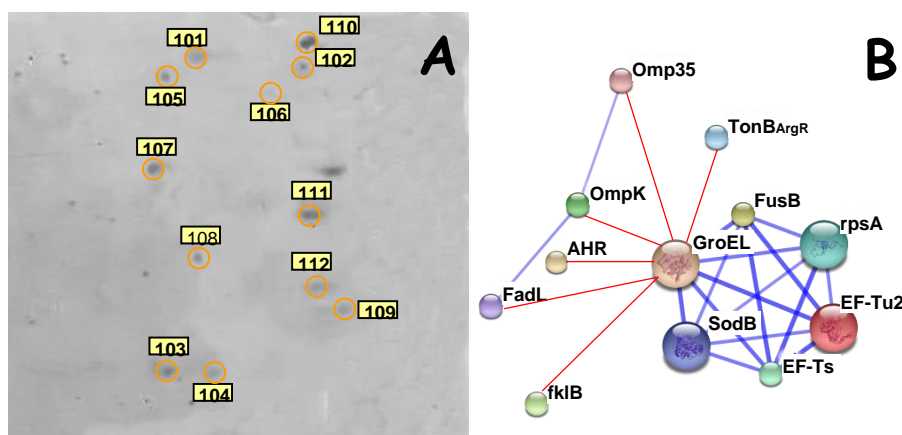


Figura R22. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GroEL de los cultivos de *S. oneidensis* a 4°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

En la muestra de 30°C el principal grupo funcional representado, con respecto a los demás, es el correspondiente a proteínas de membrana y transporte del que se han identificado 11 manchas proteicas.

Resultados

Tabla R34. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con GroEL en *S. oneidensis* a 30°C.*Mezcla de proteínas identificadas en la misma mancha.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
118	alkyl hydroperoxide reductase	<i>Shewanella</i> sp. MR-4	253	YP_734504	34%	5.01	22086	M. Redox
110	alcohol dehydrogenase II	<i>S. oneidensis</i> MR-1	150	NP_717107	50%	5.68	40387	M. Carbohid.
114	leucine dehydrogenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	136	NP_718222	43%	5.77	37343	M. Amin.
116	Malate dehydrogenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	137	MDH_SHEON	47%	5.37	32288	M. Amin.
101*	TonB-dependent receptor domain-containing protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	215	NP_718479	35%	4.54	95930	Transp./Memb.
101*	TonB-dependent receptor	<i>S. oneidensis</i> MR-1	113	NP_718056	25%	4.49	97928	Transp./Memb.
111*	extracellular solute-binding protein	<i>Shewanella</i> sp. MR-4	188	YP_735994	66%	6.47	29419	Transp./Memb.
112	flagellin	<i>S. oneidensis</i> MR-1	130	NP_718792	49%	7.90	28451	Transp./Memb.
113	hypothetical protein SO_4719	<i>S. oneidensis</i> MR-1	352	NP_720235	84%	6.46	29348	Transp./Memb.
117	OmpA family protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	383	NP_719092	25%	4.76	40271	Transp./Memb.
103	TonB-dependent heme/hemoglobin receptor HmuA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	112	NP_719210	38%	4.80	76438	Transp./Memb.
104	enterobactin receptor protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	139	NP_720043	41%	4.81	73259	Transp./Memb.
105	TonB-dependent receptor, putative	<i>S. oneidensis</i> MR-1	197	NP_717099	42%	4.81	90371	Transp./Memb.
107	long-chain fatty acid transport protein, putative	<i>S. oneidensis</i> MR-1	171	NP_718661	59%	4.53	47034	Transp./Memb.
108	outer membrane porin Omp35	<i>S. oneidensis</i> MR-1	301	NP_719427	73%	4.70	39874	Transp./Memb.
109	universal stress protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	136	NP_719222	79%	5.26	15642	Estrés/chap.
102	chaperonin GroEL	<i>S. oneidensis</i> MR-1	273	NP_716337	56%	4.84	57101	Estrés/chap.
111*	two-component response regulator	<i>S. oneidensis</i> MR-1	90	NP_719518	45%	5.51	27260	Estrés/chap.
106	elongation factor Tu	<i>S. oneidensis</i> MR-1	313	NP_715857	76%	5.13	43605	Replic./Trad.
115	elongation factor Ts	<i>S. oneidensis</i> MR-1	147	NP_717241	12%	5.31	30509	Replic./Trad.

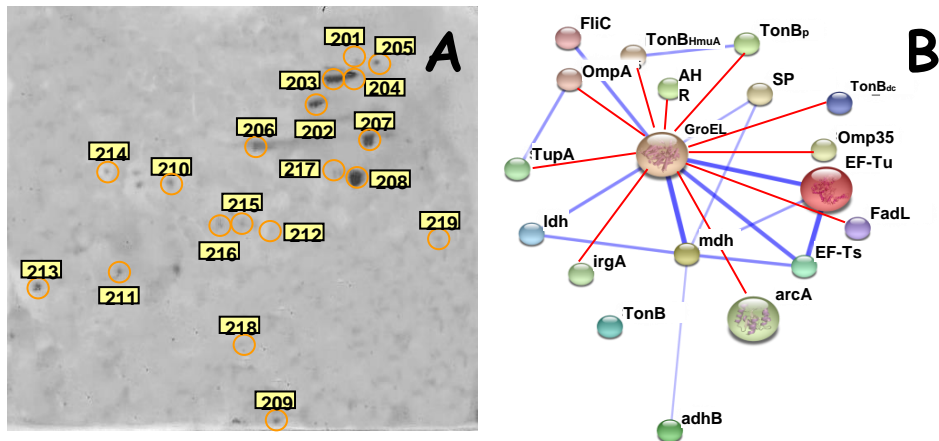


Figura R23. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GroEL de los cultivos de *S. oneidensis* a 30°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

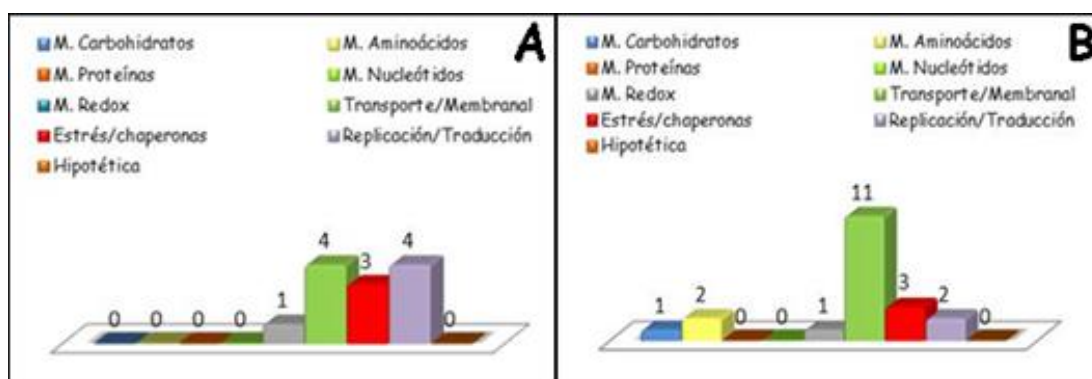


Figura R24. Abundancia de proteínas según su grupo funcional correspondiente a las inmunoprecipitaciones con anti-GroEL a partir de cultivos de *S. oneidensis* a 4°C (A) y 30°C (B). Las categorías establecidas son: Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción e hipotéticas.

4. 2. 2. Identificación de proteínas que interaccionan *in vivo* con DnaK en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en *Shewanella oneidensis*.

En el caso de los extractos de cultivos de *S. oneidensis* inmunoprecipitados con el anticuerpo específico anti-DnaK identificamos un mayor número de manchas proteicas a 4°C (Tabla R35 y figura R25) donde además aparecen representados casi todos los grupos funcionales a excepción de los correspondientes a proteínas hipotéticas y de metabolismo de proteínas.

Tabla R35. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *S. oneidensis* a 4°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
307	Alkyl hydroperoxide reductaset	<i>Shewanella sp.</i> MR-4	140	YP_734504	18%	5.01	22086	M. Redox
303	Alcohol dehydrogenase II	<i>S. oneidensis</i> MR-1	120	NP_717107	17%	5.68	40387	M. Carbohid.
304	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	154	NP_717289	23%	5.63	54157	M. Carbohid.
302	Leucine dehydrogenase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	163	NP_718222	15%	5.77	37343	M. Amin.
306	Adenylate kinase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	111	NP_717624	25%	5.57	23136	M. Nucl.
309	Nucleoside diphosphate kinase	<i>S. oneidensis</i> MR-1	144	NP_717870	46%	5.50	15530	M. Nucl.
305	Flagellin	<i>S. oneidensis</i> MR-1	148	NP_718792	23%	7.90	28451	Transp./Memb.
313	Long-chain fatty acid transport protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	100	NP_718661	11%	4.53	47034	Transp./Memb.
312	Outer membrane porin, putative	<i>S. oneidensis</i> MR-1	239	NP_719427	17%	4.70	39874	Transp./Memb.
301	Hypothetical protein SO_4719	<i>S. oneidensis</i> MR-1	168	NP_720235	61%	6.46	29348	Transp./Memb.
308	Universal stress protein	<i>S. oneidensis</i> MR-1	166	NP_719222	32%	5.26	15642	Estrés/chap.
310	Co-chaperonin GroES	<i>S. oneidensis</i> MR-1	109	NP_716336	29%	5.37	10207	Estrés/chap.
311	Elongation factor Tu	<i>S. oneidensis</i> MR-1	212	NP_715857	31%	5.13	43605	Replic./Trad.
314	Hypothetical protein SO_3765	<i>S. oneidensis</i> MR-1	92	NP_719302	41%	6.38	25374	Hipotéticas

Resultados

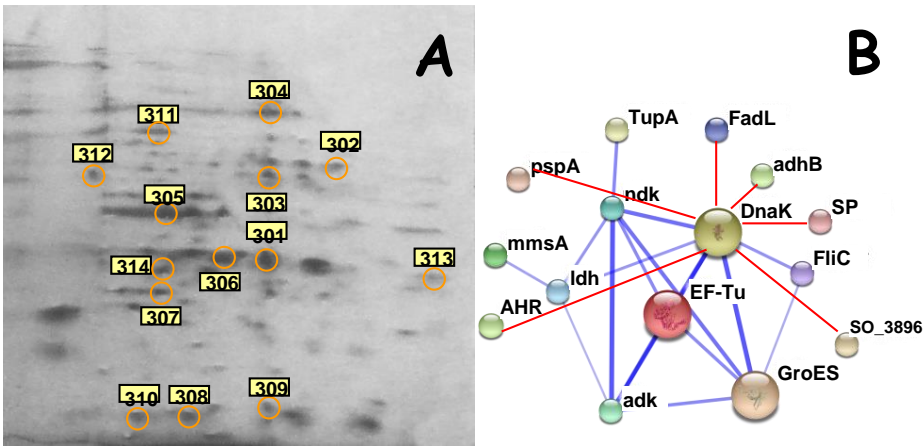


Figura R25. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DnaK de los cultivos de *S. oneidensis* a 4°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Tabla R36. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *S. oneidensis* a 30°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
401	Extracellular solute-binding protein	<i>S. putrefaciens</i> CN-32	212	YP_001185384	31%	6.15	29511	Transp./Memb.
102	Hypothetical protein SO_4719	<i>S. oneidensis</i> MR-1	339	NP_720235	61%	6.46	29348	Transp./Memb.
403	Outer membrane porin, putative	<i>S. oneidensis</i> MR-1	227	NP_719427	72%	4.70	39874	Transp./Memb.
405	Flagellin	<i>S. oneidensis</i> MR-1	103	NP_718792	35%	7.90	28451	Transp./Memb.
404	Elongation factor Tu	<i>S. oneidensis</i> MR-1	128	NP_715857	33%	5.13	43605	Replic./Trad.
406	DnaK	Estrés/chap.

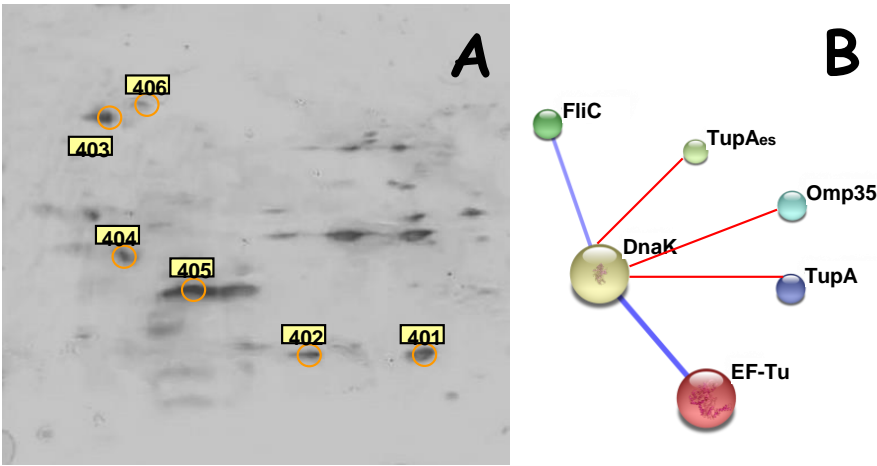


Figura R26. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DnaK de los cultivos de *S. oneidensis* a 30°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

En los extractos de 30°C se han identificado 5 manchas proteicas de las cuales 4 se clasifican en el grupo de proteínas membranales y de transporte y una perteneciente a replicación y traducción.

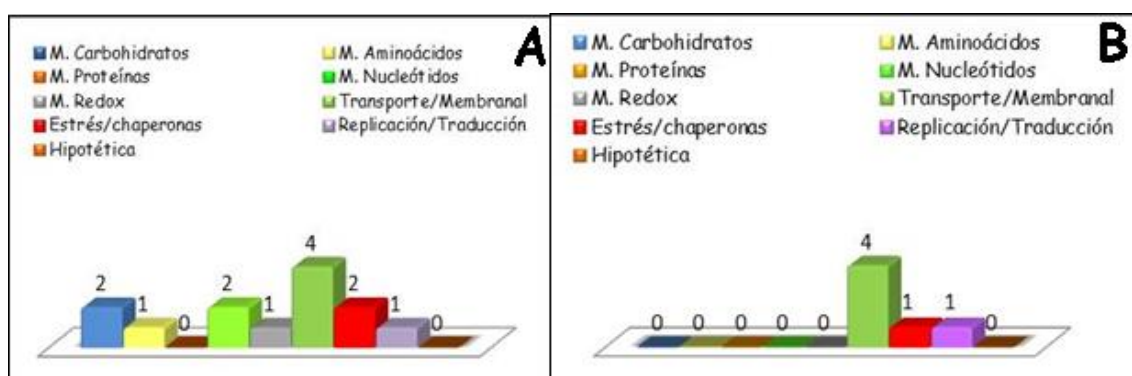


Figura R27. Abundancia de proteínas según su grupo funcional correspondiente a las inmunoprecipitaciones con anti-DnaK a partir de cultivos de *S. oneidensis* a 4°C (A) y 30°C (B). Las categorías establecidas son: Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción e hipotéticas.

4. 2. 3. Identificación de que interaccionan *in vivo* con GroEL en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en *Shewanella frigidimarina*.

No existen apenas diferencias en el número de manchas de proteínas identificadas entre los extractos procedentes de cultivos a 4°C (figura R28 y tabla R37) y cultivos a 30°C (figura R29 y tabla R38) tras las inmunoprecipitaciones con anticuerpo anti-GroEL y separación mediante 2-DE en la especie en *S. frigidimarina*.

Resultados

Tabla R37. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con GroEL en *S. frigidimarina* a 4°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
101	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 132	YP_750145	21%	5.22	22198	M. Redox	
107	Dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 84	YP_752441	27%	5.51	50860	M. Amin.	
104	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 165	YP_751222	47%	4.50	56299	M. Nucl.	
105	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 112	YP_751223	27%	4.32	67244	M. Nucl.	
103	Porin	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 134	YP_749202	44%	4.60	37708	Transp./Memb.	
106	TonB-dependent receptor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 87	YP_751099	22%	4.19	90485	Transp./Memb.	
102	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 134	YP_748847	33%	5.07	43547	Replic./Trad.	

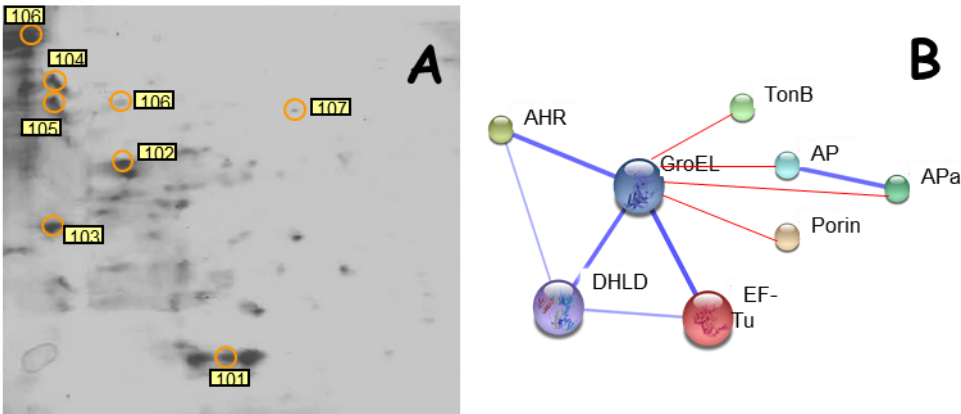


Figura R28. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GroEL de los cultivos de *S. frigidimarina* a 4°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Tabla R38. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con GroEL en *S. frigidimarina* a 30°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
201	TonB-dependent receptor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	97	YP_751099	24%	4.19	90485	Transp./Memb.
203	Porin	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	123	YP_749202	39%	4.60	37708	Transp./Memb.
204	Nucleoside-specific channel-forming protein, Tsx	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	134	YP_749692	15%	4.62	31160	Transp./Memb.
202	Chaperonin GroEL	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	211	YP_752326	53%	4.83	57115	Estrés/chap.
205	Superoxide dismutase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	147	YP_750435	35%	5.16	21621	Estrés/chap.
206	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	172	YP_748847	51%	5.07	43547	Replic./Trad.

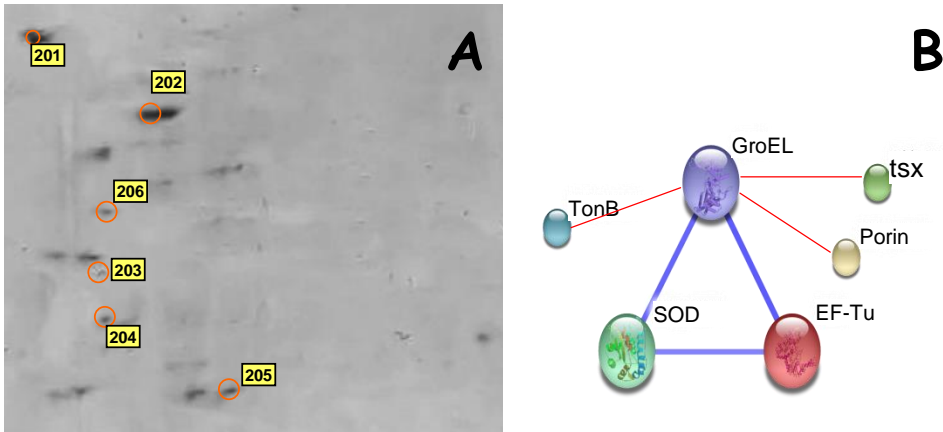


Figura R29. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GroEL de los cultivos de *S. frigidimarina* a 30°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Sí vemos diferencias en los grupos funcionales (figura R30) que hemos encontrado: a 30°C identificamos 3 proteínas membranales y de transporte, 2 de respuesta a estrés y 1 de replicación y síntesis, el factor de elongación Tu que también aparece a 4°C. En esta temperatura no hemos podido identificar proteínas de estrés pero aparece al menos uno o dos representantes de otros grupos funcionales que no vemos a 30°C como de metabolismo de aminoácidos y nucleótidos y redox.

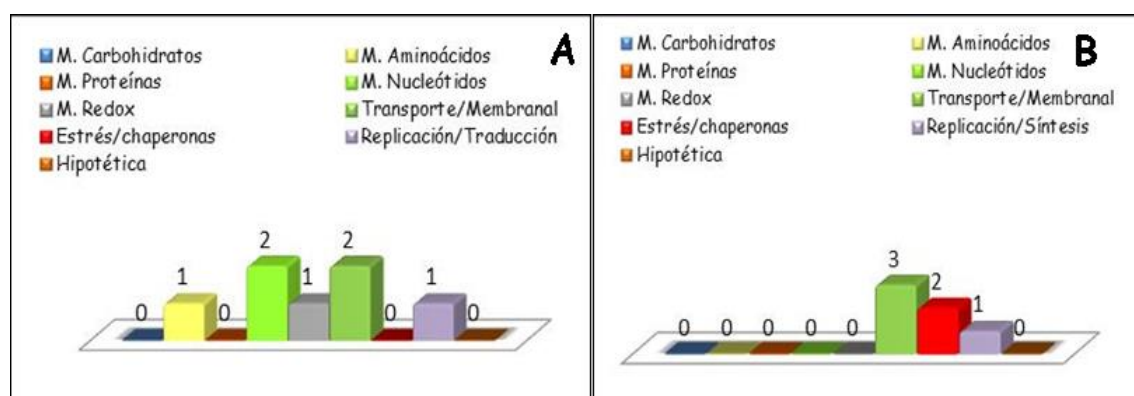


Figura R30. Abundancia de proteínas según su grupo funcional correspondiente a las inmunoprecipitaciones con anti-GroEL a partir de cultivos de *S. frigidimarina* a 4°C (A) y 30°C (B). Las categorías establecidas son: Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción e hipotéticas.

4. 2. 4. Identificación de proteínas que interaccionan *in vivo* con DnaK en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en *Shewanella frigidimarina*.

Tabla R39. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *S. frigidimarina* a 4°C.

NºMancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
303	Alkaline phosphatase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	146	YP_751222	42%	4.50	56299	M. Redox
301	TonB-dependent receptor	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	122	YP_751099	30%	4.19	90485	Transp./Memb.
302	TonB-dependent receptor, plug	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	122	YP_749517	42%	4.37	71830	Transp./Memb.
307	OmpA/MotB domain-containing protein	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	177	YP_751577	17%	5.44	41493	Transp./Memb.
304	Porin	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	168	YP_749202	43%	4.60	37708	Transp./Memb.
305	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	92	YP_748847	31%	5.07	43547	Replic./Trad.
306	Hypothetical protein Sfri_1465	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	310	YP_750155	34%	5.13	41434	Hipotética

Resultados

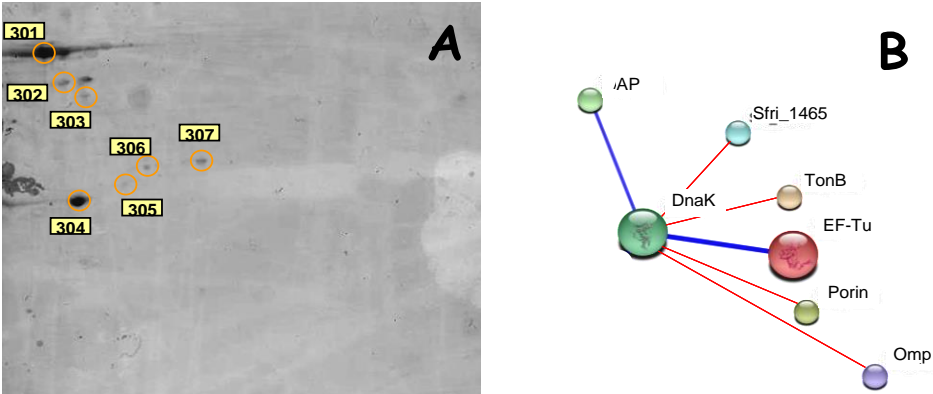


Figura R31. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DnaK de los cultivos de *S. frigidimarina* a 4°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Tabla R40. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *S. frigidimarina* a 30°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
405	Alkyl hydroperoxide reductase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	105	YP_750145	28%	5.22	22198	M. Redox
406	Porin	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	92	YP_749202	45%	4.60	37708	Transp./Memb.
402	Superoxide dismutase	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	124	YP_750435	41%	5.16	21621	Estrés/chap.
401	Elongation factor Tu	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	147	YP_748847	52%	5.07	43547	Replic./Trad.
403	Ribosome recycling factor (rrf)	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	95	YP_749964	47%	5.27	20646	Replic./Trad.
404	Hypothetical protein Pcryo_1042	<i>P. cryohalolentis</i> K5	89	YP_580307			24558	Hipotética

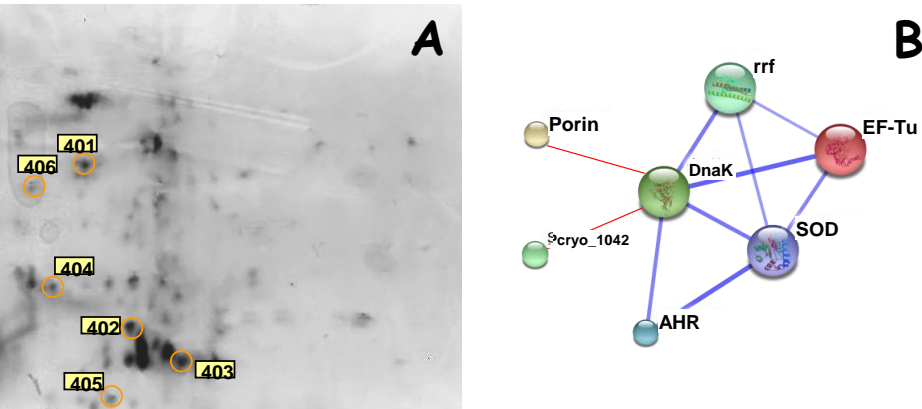


Figura R32. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DnaK de los cultivos de *S. frigidimarina* a 30°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Se identifican 7 manchas protéicas en el extracto procedente de cultivos de *S. frigidimarina* de 4°C inmunoprecipitados con anticuerpo anti-DnaK. De éstas, 4 se clasifican como proteínas membranales y de transporte y aparece un representante de los grupos metabolismo redox, traducción y replicación e hipotéticas. En el caso de los extractos procedentes de cultivos a 30°C el número total de manchas identificadas es

de 5: una de metabolismo redox, una de transporte y membranar, una chaperona (superóxido dismutasa) y de estrés y dos de replicación y traducción.

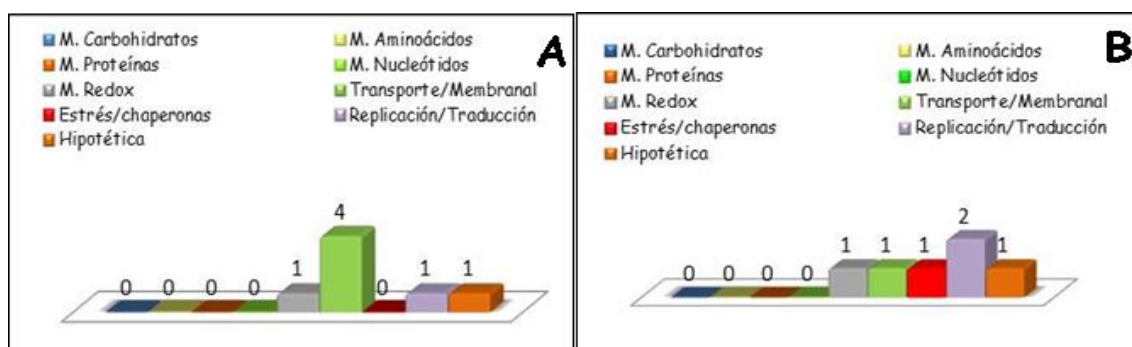


Figura R33. Abundancia de proteínas según su grupo funcional correspondiente a las inmunoprecipitaciones con anti-DnaK a partir de cultivos de *S. frigidimarina* a 4°C (A) y 30°C (B). Las categorías establecidas son: Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción e hipotéticas.

4. 2. 5. Identificación de proteínas que interaccionan *in vivo* con GroEL en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en *Psychrobacter frigidicola*.

Tabla R41. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *P. frigidicola* a 4°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
101	rplF gene product	<i>P. arcticus</i> 273-4	95	YP_263801	6%	9.40	19510	Replic./Trad.
102	Superoxido dismutase	<i>P. arcticus</i> 273-4	140	YP_265220	34%	5.03	23574	Estrés/chap.
103	Tellurium resistance protein TerD	<i>P. arcticus</i> 273-4	95	YP_264050	37%	4.34	20425	Estrés/chap.
104	GroEL	Estrés/chap.

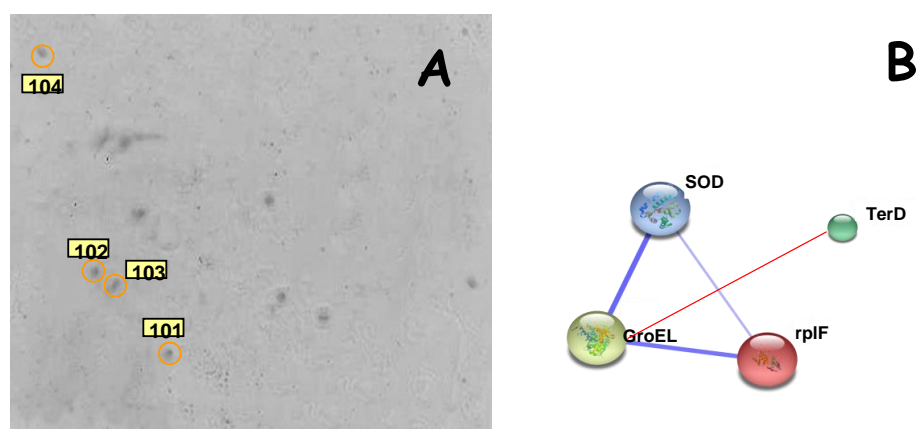


Figura R34. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GroEL de los cultivos de *P. frigidicola* a 4°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Resultados

Tabla R42. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *P. frigidicola* a 30°C.

NºMancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
201	slyD gene product	<i>P. arcticus</i> 273-4	91	YP_263587	6%	4.59	17415	Replic./Trad.
202	Tellurium resistance protein TerD	<i>Psychrobacter</i> sp. 1501	82	ZP_08460790	6%	4.69	21019	Estrés/chap.
204	Tellurium resistance protein TerD	<i>P. arcticus</i> 273-4	85	YP_264050	39%	4.36	20425	Estrés/chap.
203	Stress protein	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	75	YP_001278987	7%	4.41	20381	Estrés/chap.
205	DnaK	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	90	YP_001281261	15%	4.57	69094	Estrés/chap.
206	GroEL	<i>P. frigidicola</i>	187	B2ZRG7	28%	4.75	57981	Estrés/chap.
207	Superoxido dismutase	<i>P. arcticus</i> 273-4	159	YP_265220	34%	5.03	23574	Estrés/chap.

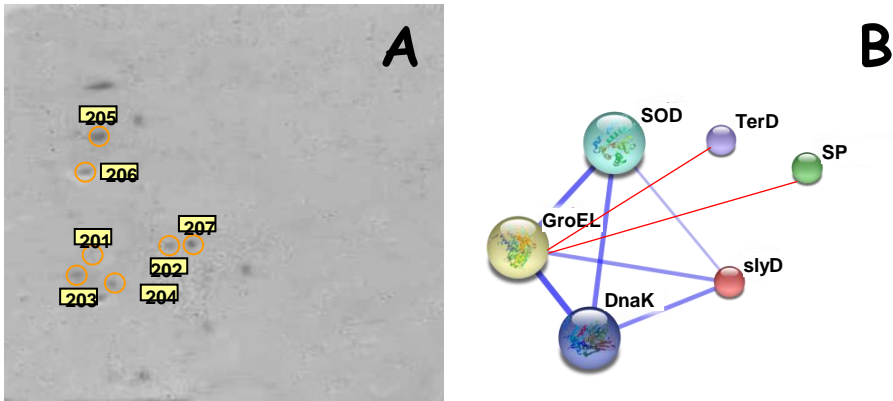


Figura R35. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GroEL de los cultivos de *P. frigidicola* a 30°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Las proteínas identificadas en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico anti-GroEL en *P. frigidicola* se reducen a los grupos funcionales de chaperonas y proteínas de estrés, identificando 6 a 30°C y 2 a 4°C, y el grupo de replicación y traducción donde aparece una única representante en cada temperatura.

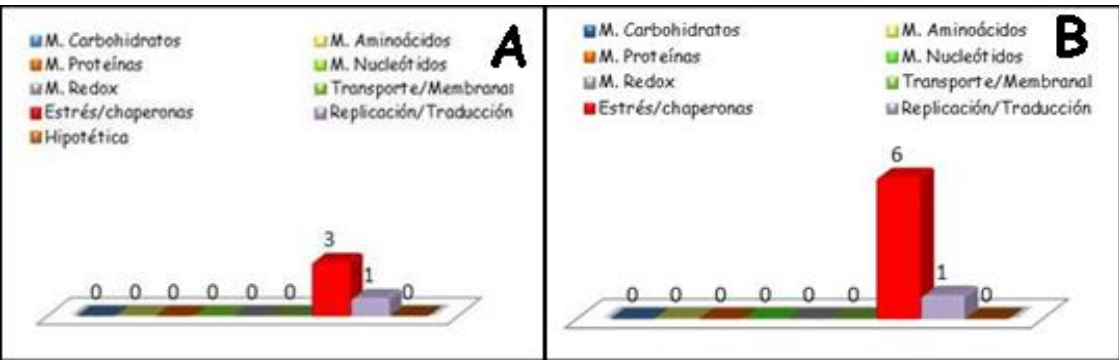


Figura R36. Abundancia de proteínas según su grupo funcional correspondiente a las inmunoprecipitaciones con anti-GroEL a partir de cultivos de *P. frigidicola* a 4°C (A) y 30°C (B). Las categorías establecidas son: Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción e hipotéticas.

4. 2. 6. Identificación de proteínas que interaccionan *in vivo* con DnaK en extractos de cultivos de 4°C y 30°C en *Psychrobacter frigidicola*.

Tabla R43. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *P. frigidicola* a 4°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
301	Superoxide dismutase	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	73	YP_001279214	33%	4.97	23481	Estrés/chap.
302	DnaK	Estrés/chap.

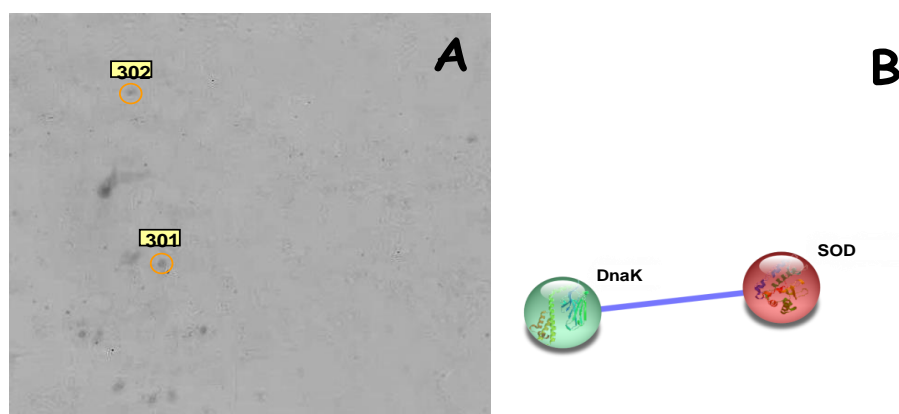


Figura R37. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DnaK de los cultivos de *P. frigidicola* a 4°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Tabla R44. Proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con DnaK en *P. frigidicola* a 30°C.

NºMancha	Proteína identificada	Especie	Score	Cód. acceso	% SC	pI	M.M (Da)	Grupo
401	TonB-dependent siderophore receptor	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	84	YP_001280393	2%	4.94	81639	Transp./Memb
402	Stress protein	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	71	YP_001278987	7%	4.41	20381	Estrés/chap.
403	Tellurium resistance TerD	<i>P. arcticus</i> 273-4	103	YP_264050	6%	4.36	20425	Estrés/chap.
404	Chaperone protein ClpB	<i>Psychrobacter</i> sp. 1501	90	ZP_08460054	13%	5.06	96057	Estrés/chap.
405	DnaK	<i>Psychrobacter</i> sp. PAMC 21119	70	ZP_10789086	10%	4.50	69456	Estrés/chap.
406	GroEL	<i>P. frigidicola</i>	82	ACD68572	11%	4.75	57981	Estrés/chap.

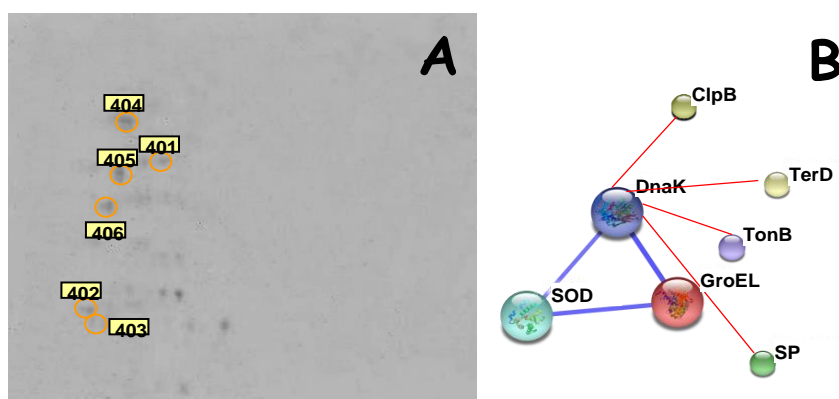


Figura R38. Separación electroforética mediante 2-DE de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DnaK de los cultivos de *P. frigidicola* a 30°C (A) y representación gráfica de las interacciones entre ellas (B). Las líneas azules corresponden a la predicción hecha por el programa STRING; las líneas rojas representan las interacciones encontradas. Las etiquetas indican las manchas proteicas escindidas del gel, tripsinizadas e identificadas por espectrometría de masas.

Resultados

En las muestras de 4°C inmunoprecipitadas con anti-DnaK (figura R37 y tabla R43) de *P. frigidicola* identificamos, interaccionando con DnaK, sólo una proteína del grupo chaperonas y de estrés (superóxido dismutasa) y 5 del mismo grupo a 30°C (figura R38 y tabla R44). A 30°C aparece una proteína membranal y de transporte.

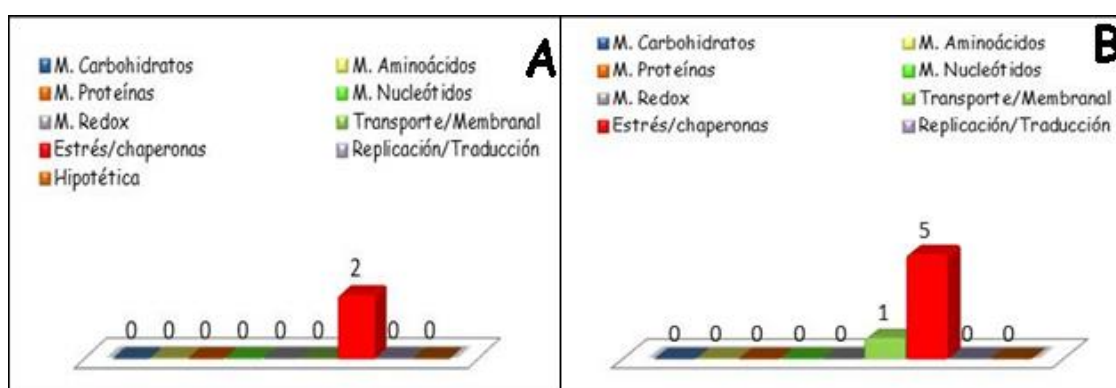
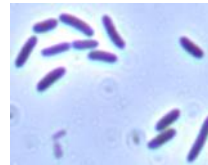
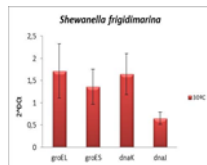
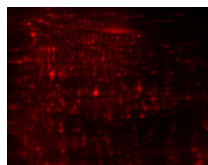
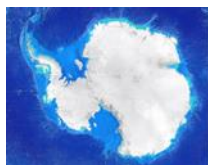
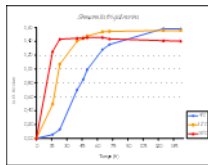
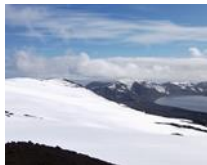
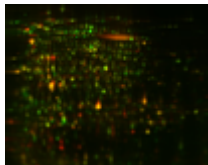
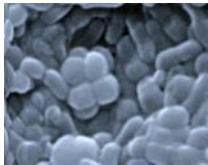


Figura R39. Abundancia de proteínas según su grupo funcional correspondiente a las inmunoprecipitaciones con anti-DnaK a partir de cultivos de *P. frigidicola* a 4°C (A) y 30°C (B). Las categorías establecidas son: Metabolismo de carbohidratos (M. Carbohidratos), Metabolismo de aminoácidos (M. Aminoácidos), Metabolismo de proteínas (M. Proteínas), Metabolismo de nucleótidos (M. Nucleótidos), Metabolismo redox (M. Redox), de transporte y membranales, de estrés y chaperonas, de replicación y traducción e hipotéticas.

Discusión



A pesar de que en la literatura científica existen numerosos trabajos que estudian los mecanismos de adaptación a la temperatura de los microorganismos y el papel de las proteínas chaperonas en esta adaptación térmica pocos son los que relacionan y comparan la influencia sobre estos mecanismos moleculares de adaptación del genoma frente al ambiente. Para la búsqueda de los umbrales de perturbación y adaptación térmica el primer paso es la selección adecuada de las especies de estudio para su comparación (Hochachka y col., 2002). La escasa existencia de datos que caractericen los mecanismos moleculares con los que los microorganismos psicrófilos responden frente al aumento de temperatura nos ha llevado al estudio del comportamiento de la bacteria psicrotolerante *Shewanella frigidimarina* que comparte gran parte de su genoma con la mesófila *Shewanella oneidensis* y que procede del mismo ambiente, la Antártida, que otra bacteria psicrófila *Psychrobacter frigidicola*.

Debido a que las proteínas suponen la maquinaria activa de la célula que controlan el equilibrio entre sustratos y productos, el intercambio entre nutrientes y productos de desecho, el ensamblaje de macromoléculas, el dinamismo de los ácidos nucleicos y el adecuado plegamiento de otras proteínas (D'Amico y col., 2006) gran parte de este estudio se ha basado en aproximaciones proteómicas.

Para caracterizar la repuesta de las tres especies mencionadas frente a los cambios de temperatura hemos considerado un abordaje desde diferentes puntos que incluyen el comportamiento en ensayos de crecimiento a diferentes temperaturas, cambios en la expresión génica y proteica de chaperonas de las principales familias de Hsps en función de la temperatura de cultivo así como la expresión diferencial del proteoma total de estas especies cultivadas a las dos temperaturas a las que se observan las mayores variaciones en los experimentos previos, 4°C y 30°C. Además, queremos establecer las principales interacciones de proteínas con las chaperonas DnaK y GroEL, que tienen lugar a estas temperaturas, mediante inmunoprecipitación con

anticuerpos específicos y posterior separación e identificación por medio de electroforesis bidimensional y espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF.

1. Crecimiento de las tres especies de estudio en función de la temperatura.

La metodología aplicada parte de un sistema de cultivo cerrado en el que sólo hay aporte de nutrientes en el inicio, que no se renuevan a lo largo del período de multiplicación, y en el que tampoco hay salida de los productos de desecho que se van generando (Brock y col., 2004).

Para cada especie estudiada los ensayos de crecimiento se han realizado a 3 temperaturas diferentes en matraces independientes para cada una de ellas sin aplicar un *shock* de elevación o disminución de temperatura a lo largo del periodo de multiplicación; sin embargo, la siembra de dichos matraces ha partido de un único preinóculo para cada especie crecido a 30°C para los ensayos con *S. oneidensis* y 15°C para *S. frigidimarina* y *P. frigidicola*.

El comportamiento global de las tres especies estudiadas en lo que se refiere a crecimiento y multiplicación de la biomasa cuando son sometidas a temperaturas bajas (4°C), templadas (12°C) y cálidas (30°C) de crecimiento parecen ser bastante similares a pesar de que entre ellas encontramos diferencias de hábitat, temperatura óptima e incluso diferencias genéticas.

La especie mesófila *S. oneidensis* aislada inicialmente del Lago Oneida en New York el cual permanece helado y con temperaturas muy próximas a 0°C durante casi medio año tiene un crecimiento óptimo descrito a 30°C (Venkateswaran y col., 1999) pero, al igual algunas otros mesófilas aislados del permafrost Ártico y Antártico (Steven y col., 2006), tiene la capacidad de comportarse como una bacteria psicrotolerante (Gao y

col., 2006) creciendo sin demasiados problemas a 4°C e incluso, en nuestro estudio, alcanzando una mayor biomasa que los cultivos a 30°C. Hay que destacar que el crecimiento a bajas temperaturas está marcado por una extendida fase de retardo o fase 'lag' (Abboud y col., 2005) que no se observa cuando crece a 30°C. Para esta especie el paso del preinóculo crecido a 30°C a un posterior cultivo a 4°C supone una considerable bajada de temperatura en un periodo corto de tiempo. Como hemos señalado, *S. oneidensis* tiene la capacidad de comportarse como una bacteria psicrotolerante y responde a esta bajada de temperatura con una extendida fase lag de readaptación (Hébraud y col., 1999) como también está descrito para otras típicas mesófilas como *Escherichia coli* (Jones y col., 1987).

Si nos detenemos a comparar el crecimiento en las mismas condiciones para otra bacteria del género *Shewanella* pero en esta ocasión psicrófilo facultativo o psicrotolerante, *S. frigidimarina*, observamos un perfil bastante parecido al anterior (figura R1.B) con una extendida fase 'lag' cuando los cultivos de esta bacteria crecen a 4°C y un crecimiento exponencial muy marcado con ausencia de fase lag en el desarrollo a 30°C, temperatura mucho más cercana a su óptima descrita pero más alejada de la temperatura de cuyo ambiente fue aislada (Bowman y col., 1997). A pesar de que en el año 1997 John P. Bowman describió la especie marcando su óptimo de temperatura en torno a los 20°C y señalando que no había crecimiento a 30°C nuestros resultados contradicen lo dicho entonces.

En las bacterias adaptadas al frío existen factores reguladores que permiten el mantenimiento de la maquinaria de traducción a bajas temperaturas. El crecimiento de las bacterias psicrotolerantes cesa transitoriamente tras una bajada de temperatura hasta que se readaptan y activan sus mecanismos reguladores que les permiten crecer a estas nuevas frías temperaturas (Hébraud y col., 1999); aparece, por ello, una apreciable fase lag al inicio del crecimiento tal y como se observa para *S. oneidensis* y

Discusión

S. frigidimarina en las curvas de 12°C y, especialmente, en las curvas de 4°C. En el crecimiento a 12°C para *S. frigidimarina* el inicio parece más favorable que a 4°C puesto que apenas hay variación con respecto a la temperatura del preinóculo y a su óptimo descrito.

P. frigidicola, es una bacteria psicrófila estricta con una temperatura óptima de crecimiento entre los 14°C y los 16°C. La estirpe estudiada, ACAM 304 aislada del suelo ornitogénico de la Antártida tiene un teórico máximo en 22°C (Bowman y col., 1996) pero el crecimiento a 30°C ha sido observado en nuestro estudio, con la consideración de una rápida entrada en la fase de estacionaria.

Ya en el año 1975 Richard Y. Morita indicaba que para las bacterias psicrófilas aunque el supuesto máximo crecimiento se observe a la temperatura óptima señalada para cada especie la máxima cantidad de biomasa en un cultivo se obtiene cuando éste se incuba durante un largo periodo de tiempo por debajo de ese valor óptimo, probablemente, debido a la eficiencia en el uso de los sustratos (Morita y col., 1975), algo que hemos observado se produce en las tres especies estudiadas en este trabajo.

No hay que perder de vista que el crecimiento microbiano es el resultado de una secuencia de reacciones químicas interrelacionadas (Hébraud y col., 1999) y que, además de la temperatura, hay otros muchos factores que están influyendo en este crecimiento como la disponibilidad y cantidad de nutrientes (Russell y col., 1990).

Las extendidas fases lag de las curvas a 12°C y 4°C de *P. frigidicola* nos indican que, probablemente, esta especie psicrófila es más sensible a la generalizada disminución de la afinidad específica que se experimenta a bajas temperaturas (Nedwell y col., 1994) y necesita un mayor tiempo de readaptación al medio y las condiciones. Además, se trata de un psicrófilo estricto que proviene de un ambiente en el que está compitiendo con otros psicrotolerantes los cuales son predominantes en la mayoría de

los ambientes polares (Nedwell y col., 1994) y están mejor adaptados y preparados para cambios de temperatura y fluctuaciones (Barros y col., 1978).

A la vista de los perfiles de crecimiento similares de las distintas especies (figura R5) y teniendo en cuenta las diferencias entre mesófilos y psicrófilos se nos plantea una pregunta sobre si el crecimiento a bajas temperaturas de los psicrófilos se produce de manera lenta: ¿Tienen los psicrófilos y los mesófilos equivalentes tasas de crecimiento con respecto a su óptimo de temperatura? La respuesta parece positiva, pero siempre manteniendo presente la gran variación entre las tasas de crecimiento de diferentes organismos tanto dentro de un mismo grupo como la dependencia de cada individuo de otros parámetros de crecimiento como la disponibilidad de oxígeno y la naturaleza de los nutrientes (Russell y col., 1998).

2. Variación en los niveles de expresión de los sistemas de chaperonas GroEL/GroES y DnaK/DnaJ en las especies de estudio en función de la temperatura.

Las chaperonas GroEL y DnaK ejercen un papel importante en la adaptación al estrés térmico. Una de sus principales funciones es la de replegar correctamente las proteínas mal plegadas o desnaturalizadas evitando la formación de agregados perjudiciales que, entre otras causas, puedan formarse como consecuencia de un estrés térmico representando un problema más marcado y grave cuando el estrés es debido al calor que cuando ocurre por frío (Phadtare, 2004).

Las interacciones y cooperaciones de estas chaperonas han sido descritas a lo largo de las últimas dos décadas así como su papel en el plegamiento de proteínas sintetizadas de novo, proteínas desnaturalizadas por efecto tanto del calor como del frío y proteolisis de agregados aberrantes (Gragerov, 1992; Phadtare, 2004; Robin y

Discusión

col., 2009). También se ha demostrado su acción conjunta y sucesiva en la ejecución de estas funciones actuando inicialmente el grupo DnaK/DnaJ en el reconocimiento de la proteína sustrato y la estabilización de una conformación intermedia operando, a continuación, GroEL/GroES mediante la hidrólisis de ATP para catalizar la producción del estado nativo de la proteína que es transferida desde DnaK/DnaJ (Langer y col., 1992).

Los niveles elevados de estas chaperonas revelados mediante inmunodetección en *S. oneidensis* a 30°C, podrían indicarnos que, aún siendo óptimo para su crecimiento, el ambiente cálido supone para ella una situación de estrés a la que hace frente con la síntesis y actividad de las Hsps GroEL/GroES y DnaK. Se trata de una bacteria mesófila capaz de actuar como una psicotolerante (Gao y col., 2006) con un comportamiento frente a las distintas temperaturas muy parecido a *S. frigidimarina* que pertenece a este grupo, más diverso que los psicrófilos, y cuyas propiedades térmicas solapan con las de algunos mesófilos (Russell, 1990). En el crecimiento a 4°C de la especie *S. oneidensis* se detectan altos niveles de expresión de la chaperonina GroES, incluso ligeramente más que a 30°C, pues es una Hsp abundantemente producida a bajas temperaturas en algunas especies del género *Shewanella* (Miyake y col., 2007).

La inmunodetección de estas Hsps en las especies con procedencia original en la Antártida no muestra niveles detectables en las muestras de 4°C. Sin embargo, sí aparecen a 30°C: GroEL, DnaK/DnaJ en las muestras de *S. frigidimarina* y GroEL y DnaK en las muestras de *P. frigidicola*. Esto sugiere que, a pesar de las temperaturas óptimas para el crecimiento de estas bacterias (20°C para *S. frigidimarina* y 15°C para *P. frigidicola*), la supervivencia y multiplicación a 4°C no está directamente relacionada con una respuesta al estrés que implique a estas Hsps y, quizá, la aclimatación requiera, también, otros mecanismos adaptativos. Además, como cabía esperar, el crecimiento a 30°C supone una situación de estrés frente a la que responden con el

aumento de los niveles de Hsps que palien la desnaturalización de proteínas, la formación de agregados aberrantes y otras consecuencias que se pueden estar originando por el aumento de temperatura.

El análisis de la expresión génica diferencial realizado a partir de la cuantificación relativa de ARNm a 30°C con respecto a 4°C de los genes *groEL*, *groES*, *dnaK* y *dnaJ* para las dos especies de *Shewanella* estudiadas no muestra, sin embargo y a diferencia de la inmunodetección, cambios significativos de expresión entre las dos temperaturas.

Varios estudios que relacionan la abundancia de ARNm y de proteínas indican que la correlación entre ambos es modesta (Gygi y col., 1999; Chen y col., 2002; Mootha y col., 2003; Cox y col., 2005; Maier y col., 2011) y que no se puede asegurar una gran consistencia en dicha correlación (Hedge y col., 2003; Nie y col., 2006). Esto es debido, en parte, a diferencias en la eficiencia entre los procesos de transcripción y traducción, así como a modificaciones post-traduccionales (Vogel y col., 2010), y limitaciones técnicas (Nie y col., 2006).

Algunos ejemplos en los que la expresión génica está alejada de la dinámica proteica se han descrito para bacterias como *Desulfovibrio vulgaris* (Nie y col., 2006) y *Mycoplasma pneumoniae* (Maier y col., 2011) donde se apunta hacia una mayor regulación de la traducción. Además, en la bacteria *M. pneumoniae* se ha comprobado para DnaK, y otras Hsps clásicas, la variabilidad entre ARNm y expresión de proteínas de manera que al inicio de un choque térmico se induce la transcripción aumentando los niveles de ARNm mientras la síntesis de proteínas apenas varía hasta pasados bastantes minutos del inicio del choque. Transcurrido un tiempo y retirada la fuente de choque térmico los niveles de ARNm caen mientras los de la proteína se elevan (Maier y col., 2011). Para *S. oneidensis* y *S. frigidimarina* el momento inicial en el cultivo a elevada temperatura puede ser una situación de inducción de la transcripción de genes que codifican proteínas Hsps. A medida que el tiempo de cultivo avanza las

Discusión

bacterias desarrollan mecanismos de adaptación que amortiguan este estrés, se aclimatan, y los niveles de mensajero disminuyen en favor del aumento de traducción y la expresión de proteínas. Además, la comparación cuantitativa en la bacteria patógena *Leptospira interrogans* revela una adaptación metabólica que implica la regulación de rutas enteras y subraya cómo la abundancia de proteínas refleja los diferentes estilos de vida de las células (Maier y col., 2011).

El análisis de la correlación entre ARNm y proteínas nos ayuda a entender las estrategias celulares para controlar los niveles de proteínas mediante los diferentes mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional (Nie y col., 2006).

3. Mecanismos moleculares de adaptación en *Shewanella frigidimarina* dependientes de la temperatura.

Los cambios en la composición del proteoma en respuesta a perturbaciones celulares revelan estrategias específicas de respuesta a estrés (Maier y col., 2011).

Cuando comparamos los resultados del experimento de 2D-DIGE en la especie *S. frigidimarina* (tabla R15) observamos los mayores cambios en cuanto a inducción de proteínas en aquellas implicadas en el estrés celular y el metabolismo redox en el crecimiento de estas bacterias a 30°C así como una fuerte represión de proteínas que normalmente están activas en los psicrotolerantes asistiendo en la supervivencia en ambientes fríos. Estas proteínas presentan los mayores cambios en la ratio obtenida.

3. 1. Aumento en la expresión de proteínas a bajas temperaturas

En ambientes con baja disponibilidad de hierro las bacterias son capaces de sobrevivir secuestrando este ion de proteínas que lo contienen pero también pueden producir y secretar quelantes específicos de hierro de bajo peso molecular llamados sideróforos. Estos unen el hierro soluble y lo transportan al interior celular mediante un sistema de

transporte y el reconocimiento específico de proteínas receptoras específicas de membrana (Krewulak, 2011). En *S. frigidimarina* este sistema parece estar activo a bajas temperaturas representado por las proteínas identificadas como canal proteico de la membrana externa (nº mancha 783), receptor sideróforo TonB-dependiente (del que hemos encontrado tres isoformas) (nº mancha 195, 189 y 188) y la porina (nº mancha 1052).

A bajas temperaturas se incrementa la solubilidad de gases, especialmente del oxígeno, y los radicales libres son más estables. Por ello, los psicrófilos en su ambiente natural están expuestos a altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ROS) pero poseen varios mecanismos para hacer frente al estrés oxidativo (Piette y col., 2010). Estos mecanismos incluyen reductasas específicas para reparar residuos oxidados, una baja frecuencia de aminoácidos oxidables y la delección de rutas metabólicas que producen ROS. La proteína glutatión reductasa (nº mancha 634), cuya expresión está aumentada en las muestras de 4°C, está implicada en la homeostasis redox de la célula actuando como un disulfito reductor (Aslund, 1999), de modo que *S. frigidimarina* aumenta su expresión probablemente para reestablecer las condiciones reducidas de la célula a bajas temperaturas.

Varias proteínas relacionadas con el metabolismo del fosfato tienen sus niveles de expresión aumentados a 4°C con respecto a 30°C para hacer frente a la amenaza energética que supone la bajada de temperatura que limita la viabilidad y disponibilidad de los nutrientes esenciales. Encontramos en *S. frigidimarina* a 4°C una sobre expresión de la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa (nº mancha 993) y dos fosfatasas alcalinas (AP) de las que, además, se presentan varias isoformas (nº mancha 2020, 411, 2019, 331 y 328). Las AP son metaloenzimas que catalizan la hidrólisis y transfosforilación de una amplia variedad de residuos (Coleman y col., 1983). Ampliamente estudiada en la cepa antártica TAB5 (Rina y col., 2000) la AP

Discusión

reúne las características propias de las enzimas adaptadas al frío: elevada actividad catalítica a bajas temperaturas y relativa inestabilidad a altas temperaturas (Koutsoulis y col., 2008).

Otras rutas metabólicas afectadas por la temperatura en *S. frigidimarina* implican al sistema agmatina deaminasa (nº mancha 951) involucrado en la tolerancia al estrés y que juega un papel importante, también, en la tolerancia al ambiente ácido en *Listeria monocytogenes* (Chen, 2011).

3. 2. Aumento en la expresión de proteínas a altas temperaturas

En algunos organismos, la producción de proteínas de choque térmico (Hsps) está asociada al incremento de la termotolerancia aumentando su capacidad de supervivencia frente a temperaturas que de otro modo serían letales. En el crecimiento de *S. frigidimarina* a 30°C se observa un incremento en la expresión de varias proteínas Hsps y de respuesta a estrés. Estas chaperonas juegan un papel importante en el sistema de control de calidad del procesamiento post-traducciona l de modo que controlan el plegamiento y mantienen la conformación adecuada de otras proteínas frente a cambios ambientales como la temperatura.

DnaK y GroEL son Hsps prototipo pertenecientes a las principales familias (Hsp70 y Hsp60, respectivamente) y que interaccionan funcionalmente con otras Hsp como son, entre otras, GrpE en el caso de DnaK y GroES en el caso de GroEL (Liberek y col., 2008; Muga y col., 2008).

En los experimentos de 2D-DIGE hemos podido comprobar un aumento de DnaK, GroEL, GroES y GrpE en las bacterias cultivadas a 30°C y de algunas de ellas, además, se observa varias isoformas (DnaK y GroEL). Esto indica la participación del complejo formado por GroEL-GroES, que permanecen unidas en presencia de ATP (Ventura y col., 2004), en la respuesta inducida por estrés térmico, esencial para la supervivencia de las células bajo estas condiciones.

Se han identificado en las muestras de cultivos a 30°C otras proteínas que participan en la regulación frente al estrés como la ferritina, de la que se identifican dos isoformas (nº mancha 1773 y 1767), implicada en la resistencia al estrés oxidativo, pertenece a la familia de proteínas Dps que protegen a la célula por su capacidad de secuestrar hierro y su actividad ferroxidasa catalizando el paso de iones ferrosos a férricos (Calhoun y col., 2011) y la proteína de choque fágico A (PspA; nº mancha 1418) que pertenece a un sistema de proteínas cuya función es el mantenimiento de la integridad de la membrana citoplasmática bajo diferentes condiciones de estrés entre las que se incluye el estrés térmico (Darwin y col., 2005).

Otras proteínas con función chaperona, son el *trigger factor* o factor de inducción (TF; nº mancha 420) que coopera con DnaK y GroEL en el plegamiento de proteínas (Robin y col., 2009) y tiene actividad peptidil-prolil transisomerasa (Deuerling y col., 1999) y la proteína adaptadora ATP dependiente de la proteasa Clp (ClpS; nº mancha 1884). Se trata de una proteasa implicada en la degradación de proteínas mediante la asistencia o provisión de los sustratos al sistema de pares chaperona-proteasa ClpAP (Roman-Hernández y col., 2011) encargado de degradar los agregados aberrantes de proteínas formados como consecuencia del aumento de temperatura (Dogan y col., 2002). Otra proteasa que aumenta su expresión a 30°C es la identificada como proteasa Do (nº mancha 791). Es una serín proteasa que regula la proteólisis mediante un control de calidad independiente de ATP y que forma parte de la familia ampliamente conservada de requerimiento a alta temperatura A (HTRA) (Clausen y col., 2011).

El estrés que supone el aumento de temperatura es uno de los principales factores que inducen la formación de estos agregados de modo que la célula necesita la acción de las chaperonas como maquinaria de control y otras proteínas que solubilizan los agregados.

Discusión

Además de proteínas relacionadas con la degradación, otras asociadas a síntesis también aumentan su expresión en los cultivos a 30°C: proteínas relacionadas con la síntesis, como varias GTPasas, factores de elongación y proteínas ribosomales.

Los factores de elongación Tu (EF-Tu; thermo unstable), del que hemos encontrado tres isoformas (nº mancha 711, 708 y 701) y que se asocia con el factor de elongación Ts (EF-Ts; thermo stable), y el factor de elongación G (EF-G; nº mancha 152) son responsables de la unión codón específica del aminoacil-ARNt y el peptidil-ARNt respectivamente, en la fase de elongación. Estos dos factores de elongación se han estudiado ampliamente en la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Raimo y col., 2004; Ruggiero y col., 2007) y se sabe que el EF-G cataliza la síntesis de proteínas mediante un mecanismo dependiente de la temperatura debido a la flexibilidad molecular de las enzimas psicrófilas. El EF-Ts forma un dímero con EF-Tu y le sirve como intercambiador de nucleótidos de guanidina ya que EF-Tu no pertenece a la familia de proteínas de unión a GTP/GDP.

La proteína identificada como GTPasa de modificación del ARNt (TrmE; nº mancha 459) es una GTPasa encargada de hidrolizar las formas oxi- y deoxi- del GTP y que ha sido aislada y caracterizada en otras especies psicrófilas como *Pseudomonas syringae*, en la que se ha demostrado su sensibilidad al calor y la disminución de su actividad a temperaturas por encima de 30°C (Singh y col., 2010).

La elevada concentración de estos factores de elongación y proteínas GTPasas en *S. frigidimarina* podría representar una herramienta adaptativa para asegurarse la eficiencia en el intercambio nucleotídico incluso en las situaciones de estrés (Sprinzl, 2000).

A pesar de esta acumulación de factores de elongación, no se observa elevación de factores de iniciación. En los procariotas la traducción suele estar iniciada a partir de la interacción entre la secuencia Shine-Dalgarno (SD) y el 5'UTR de un ARNm y la secuencia anti-SD y el 3'final de un ARN 16s ribosomal, pero existen algunos

mecanismos excepcionales que no requieren la secuencia SD para el inicio de la traducción. Uno de ellos es mediado por la proteína ribosomal S1 (Nakagawa, 2010) y este cambio en el mecanismo de iniciación podría estar promovido por una situación de estrés. Encontramos en nuestros experimentos dos isoformas de la proteína S1 30S ribosomal (nº mancha 266 y 258).

En cuanto al metabolismo redox y su implicación en la homeostasis celular hemos identificado una proteína excepcionalmente inducida por altas temperaturas de la que, además, aparecen cinco isoformas; se trata de la proteína alquil hidroperóxido reductasa descrita como una enzima de protección frente a peróxidos en *Escherichia coli* (Storz G., 1999), frente a estrés osmótico en *Staphylococcus aureus* e inducida como respuesta al aumento de temperatura en *Bacillus subtilis* mientras que en *Shewanella putrefaciens* su actividad está relacionada con la aclimatación al frío (Leblanc y col., 2003). En nuestros experimentos hemos encontrado cinco manchas proteicas que se identifican como diferentes isoformas de esta proteína, tres de ellas inducidas por calor (nº mancha 1519, 1522 y 2022) y dos inducidas por frío (1622 y 2023) de modo que *S. frigidimarina* parece emplear esta estrategia para ambos tipos de adaptación térmica.

Además, en relación con el metabolismo redox se identificó otra proteína, la cadena A del flavocitocromo c3 (nº mancha 1985) que es una proteína tetrahemopirróica con actividad catalítica fumarato reductasa ampliamente estudiada en *S. frigidimarina* (Turner y col., 1999).

Relacionada con el metabolismo de nucleótidos pero involucrada en la respuesta a estrés hemos identificado a la proteína de supervivencia en fase estacionaria (SurE; nº mancha 1409), una fosfatasa dependiente de ion metálico con actividad nucleotidasa y exopolifosfatasa (Iwasaki y col., 2007).

Discusión

Formando parte del aparato flagelar membranal la proteína asociada al flagelo FlgL (nº mancha 805) es un sustrato de las chaperonas de secreción de tipo III. Éstas actúan como guardianes citoplásmicos protegiendo a sus sustratos de la degradación y de la agregación y suponen un sensor que determina el estado de ensamblaje del flagelo (Aldridge y col., 2003).

Estos resultados sugieren que en la adaptación de *S. virgidimarina* a temperaturas extremas, alejadas de su temperatura óptima de crecimiento, están involucrados dos tipos diferentes de cambios metabólicos. A elevadas temperaturas es necesaria una red de proteínas de respuesta a estrés para evitar daños celulares, induciéndose proteínas de estrés (Hsps, proteasas y antioxidantes), proteínas implicadas en la biosíntesis, en el metabolismo energético y en la motilidad. Por otro lado, la respuesta de las células cuando crecen a 4°C es la inducción de proteínas relacionadas con la aclimatación al frío, la membrana celular, rutas energéticas y la homeostasis redox. Esta última es controlada por medio de diferentes mecanismos: a 30°C con la actividad de las proteínas Dps mientras que a 4°C el papel antioxidante lo juega la glutatión reductasa. Además, diversas isoformas de la proteína alquil hidropéroxido reductasa participan en la homeostasis redox dependiendo de la temperatura ambiental. Esta es la única proteína identificada a las dos temperaturas estudiadas.

4. Mecanismos moleculares de adaptación en *Shewanella oneidensis* dependientes de la temperatura.

4. 1. Aumento en la expresión de proteínas a bajas temperaturas

Las bacterias frecuentemente responden a cambios en su ambiente mediante la activación de rutas metabólicas que les permiten la conversión de nutrientes disponibles. La actividad de la proteína acetato kinasa controla la concentración celular de acetil-CoA y acetil fosfato, importantes metabolitos secundarios (Chittori y col., 2011). Esta enzima sintetiza acetil-CoA a partir de acetato o bien genera ATP cuando hay un exceso de acetil-CoA (Ingram-Smith y col., 2006). La fosforilación de algunas proteínas de regulación en respuesta a estrés implica mecanismos que incluyen acetil fosfato cuyo gen se induce en respuesta a escasez de fosfato en algunas bacterias (Summer y col., 1999). La temperatura, además de la fase de crecimiento, supone un factor influyente en la concentración intracelular del acetil fosfato de modo que el aumento de temperatura disminuye la expresión del gen de la acetato quinasa (Prüss y col, 1994). En nuestros experimentos encontramos una sobre expresión de la proteína acetato quinasa (nº mancha 743; taba R4) en los cultivos de 4°C de *S. oneidensis* que puede responder a la necesidad de la bacteria, en el crecimiento a bajas temperaturas, de producir energía y fosforilar a otras proteínas para su activación en respuesta a estrés.

Las oxidorreductasas son enzimas redox que catalizan la transferencia de electrones entre reductores y oxidantes y que necesitan, en la mayoría de los casos, cofactores orgánicos como los flavin nucleótidos (FMN) y nicotinamida adenin dinucleótidos fosfato (NADP), entre otros (Ming-Fen y col., 2013). *S. oneidensis* presenta un aumento de este tipo de enzimas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo cuando crece a 4°C (nº mancha 875). Estudios de inducción de esta familia de

Discusión

enzimas en *S. oneidensis* revelan su implicación en la protección de componentes celulares frente al estrés oxidativo (Brigé y col., 2006). Además, otra proteína que contribuye al incremento de acetil-CoA en la célula (Wagner y col., 1992) y cuyo nivel de expresión está aumentado a 4°C en *S. oneidensis* es la piruvato-formiato liasa (PflB) (nº mancha 298). Esta enzima tiene un papel central en el metabolismo anaeróbico de *E. coli* y produce formiato y acetil-CoA por la vía no oxidativa (Nnyepi y col., 2007).

La proteína 2-metilcitrate sintasa (PrpC) (nº mancha 867) realiza su principal función en el ciclo de oxidación del propionato a piruvato (Wilfried y col., 2002) y tiene como sustratos tanto al acetil-CoA como al propionil-CoA (Gerike y col., 1998). Esta proteína eleva su expresión en *S. oneidensis* a 4°C.

En el crecimiento de esta bacteria mesófila a 4°C es notable el incremento de expresión de proteínas con actividad peptidasa relacionadas con el metabolismo de proteínas y aminoácidos que, probablemente, responde a una necesidad de la bacteria por aumentar su energía a bajas temperaturas, como ya hemos mencionado, y a un requerimiento por remodelar la estructura de su membrana y optimizar el intercambio de nutrientes. Son la proteasa periplásmica C-terminal (Prc) (nº mancha 300), que pertenece a la familia peptidasa S41; también conocida como Tsp proteasa, degrada cadenas incompletas de polipéptidos por un sitio específico en el extremo C-terminal, actúa sobre una lipoproteína con actividad de síntesis del peptidoglicano y su ausencia provoca termosensibilidad en el crecimiento de bacterias como *E. coli* (Tadkoro y col., 2004); la dipeptidil peptidasa S46 (nº mancha 284), familia de proteasas, que agrupa a prolil y serín proteasas, crucial para el metabolismo celular y la obtención de energía a partir de la degradación de dipéptidos (Rouf y col., 2013); otra proteína de la familia de las prolil oligopeptidasas (nº mancha 363) con, además, un importante papel en señalización celular (Rosenblum y col., 2003); y las enzimas gamma glutamiltransferasa (GgtB) (nº mancha 868) y glicina dehidrogenasa o proteína P (nº

mancha 117), una descarboxilasa del complejo multienzimático que cataliza la oxidación de glicina (Okamura-Ikeda y col., 1993).

Varias proteínas relacionadas con el transporte a través de la membrana y el metabolismo del hierro aumentan su expresión durante el crecimiento de *S. oneidensis* a bajas temperaturas: la proteína receptora dependiente de Ton-B (nº mancha 115), la proteína TolB (nº mancha 706), el receptor sideróforo de hierro alcalino (nº mancha 271), proteínas de respuesta a estrés como la ferritina (nº mancha 1499) y el regulador de absorción de hierro (nº mancha 1671) así como una proteína de biosíntesis de sideróforos (nº mancha 656).

La proteína receptora dependiente de Ton-B, de la superfamilia de las porinas, presenta la ratio más alta (12,7). Se trata de una proteína receptora de la membrana externa de unión a complejos sideróforos o quelantes de hierro (Mirus y col., 2009), perteneciente a la superfamilia de las porinas. Ton-B proporciona la energía necesaria para la translocación de los complejos sideróforos a través de la membrana (Andrews y col., 2003) que son secretados en las eubacterias bajo condiciones limitantes de hierro (Ferreira y col., 1994). Las porinas interaccionan con el complejo periplásmico TolB, cuya expresión también aumenta en estas muestras y que está involucrado en el ensamblaje de las porinas en la membrana celular (Rigal y col., 1997). Otro miembro de este complejo periplásmico es TolC identificado en nuestro experimento como la proteína de aglutinación (nº mancha 543) y sobre expresada a 4°C.

El hierro es un ión importante en la respiración celular pero su homeostasis tiene que estar perfectamente regulada debido a su elevado riesgo de intoxicación por oxidación (Mirus y col., 2009). La proteína reguladora de absorción de hierro (Fur) (nº mancha 1671) está involucrada en la adquisición de hierro, la tolerancia a la acidez, la respuesta a estrés oxidativo y la quimiotaxis del flagelo (Yang y col, 2008). Esta proteína funciona como un regulador global de la homeostasis del hierro controlando tanto la absorción de hierro en condiciones limitantes como la expresión de proteínas

Discusión

que almacenan hierro y enzimas que lo utilizan cuando los niveles de este metal son altos (Lee y col., 2007). También la ferritina, de la familia Dps, protege a las bacterias frente al estrés oxidativo (Smith, 2004), secuestrando hierro para que no derive en la producción de radicales libre tóxicos, especialmente durante la fase estacionaria de crecimiento (Calhoun y col., 2011).

La biosíntesis de proteínas parece estar bastante activa a bajas temperaturas por medio del aumento de expresión de proteínas de traducción como la subunidad beta de la fenilalanina ARNt-sintetasa (nº mancha 162) y el factor G de elongación (EF-G) (nº mancha 223) y de regulación de la síntesis de precursores de aminoácidos, nucleótidos y de componentes de la membrana, como la ribosa-5-fosfato isomerasa A (nº mancha 1307), que genera precursores para la síntesis de aminoácidos, vitaminas, nucleótidos y componentes de la pared celular, y la proteína AMPc reguladora (nº mancha 1307).

De estas proteínas identificadas que aumentan su nivel de expresión a 4°C en *S. oneidensis* relacionadas con los procesos de replicación y traducción, la que posee una ratio notablemente más elevada (23,02) es el EF-G que ejerce un papel crucial en la elongación de los polipéptidos durante el proceso de síntesis de proteínas (Li y col., 2011). Promueve el paso de translocación del polipéptido que está siendo sintetizado en el ribosoma y la separación de las dos subunidades de éste, lo que requiere de su acción hidrolítica sobre el GTP (Savelsbergh y col., 2009; Li y col., 2011). A pesar de que se ha descrito que el EF-G en *E. coli* es sensible al estrés oxidativo (Nagano y col., 2012) y que puede desempeñar una función chaperona en el plegamiento de proteínas (Caldas y col., 2000) su marcado aumento de expresión a 4°C en *S. oneidensis* puede responder a la capacidad que tiene de presentar características propias de enzimas adaptadas al frío como la flexibilidad molecular (Ruggiero y col., 2007) y la necesidad de una menor energía de activación para la hidrólisis del GTP (Thomas y col., 2000).

4. 2. Aumento en la expresión de proteínas a altas temperaturas

De manera excepcional dos proteínas antioxidantes de la familia de las alquil hidroperóxido reductasas (AhpC) (nº manchas 1379 y 1479) que se inducen a bajas temperaturas en otras especies de *Shewanella* adaptadas al frío, *S. putrefaciens* (Leblanc y col., 2002) y *Shewanella* sp. Strain Ac10 (Miyake y col., 2007) aparecen inducidas en el crecimiento a 30°C de *S. oneidensis*. Estas proteínas protegen frente a los peróxidos en respuesta al estrés oxidativo en *E. coli* (Storz y col., 1999) mientras que en *Staphylococcus aureus* se inducen por estrés osmótico pero no en presencia de peróxidos. Sin embargo, *S. oneidensis*, podría compartir un mecanismo similar al de *Bacillus subtilis* en la que las AhpC se inducen como respuesta al aumento de temperatura y al estrés osmótico tras la entrada en fase estacionaria (Hecker y col., 1990; Antelmann y col., 1996).

De un modo parecido a lo que ocurría a 4°C, en el crecimiento a 30°C encontramos un aumento de expresión de proteínas implicadas en la conversión de propionato a piruvato, se trata de la 2-metil citrato deshidratasa Fe-S dependiente aconitasa D (AcnD) (nº mancha 80), descrita en *S. oneidensis* por su implicación en el catabolismo del propionato. Esta enzima cataliza la deshidratación del 2-metil citrato y del citrato y contiene un centro ferrosulfuroso siendo su actividad dependiente de hierro (Grimek y col., 2004).

Un miembro de la familia de las serín proteasas, la serín proteasa periplásmica DegQ (nº mancha 641), está inducida en el crecimiento a 30°C. Desempeña dos funciones independientes como proteasa y como chaperona. La función proteolítica es predominante a altas temperaturas mientras que a temperaturas bajas actúa como una chaperona, cuya actividad reside en los dominios PDZ. La proteasa Do/HtrA es otro miembro de esta superfamilia con dominios PDZ (Krojer y col., 2002; Kim y col., 2003).

Discusión

Las nucleósido difosfato kinasas (NdK) son enzimas ubicuas que catalizan la transferencia de grupos fosfato de nucleósidos trifosfatos (NTPs) a nucleósidos bifosfato con un importante papel en el control y procesos de desarrollo celular (Chakrabarty, 1998; Pédelacq y col., 2005). Debido a la importancia de los NTPs en la síntesis de macromoléculas y mecanismos de señalización la enzima Ndk (nº mancha 1657), inducida en las muestras de 30°C, tiene un papel fundamental en el crecimiento bacteriano y la transducción de señales (Chakrabarty, 1998).

El catabolismo de la tirosina comienza con la generación de 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) que en un paso consecutivo origina homogentisato por acción de la enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) (nº mancha 818) (Loprasert y col., 2007). Esta enzima es el único miembro de las oxigenasas alfa-ceto dependientes que requiere Fe(II) (Johnson-Winters y col., 2005). *S. oneidensis* capta tirosina del medio para producir, mediante su degradación, piomelanina, incrementando la oxido-reducción del hierro. El homogentisato es un intermediario de esta reacción, generado por la acción de la HPPD (Turick y col., 2009) y la piomelanina es un pigmento marrón difusible, un metabolito del ciclo redox, con propiedades antioxidantes y descrita en otras bacterias como *Shewanella colwelliana* D (Coon y col., 1994) y *Burkholderia cenocepacia* C5424 (Keith y col., 2007). La elevación de los niveles de la enzima HPPD en los cultivos de 30°C en *S. oneidensis* podría ser la causa de la coloración rojiza observada en estas muestras y cultivos que no se observa en los cultivos a 4°C.

La superfamilia de las amidohidrolasas comprende un notable grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de un amplio rango de sustratos con grupos amida o éster y que contienen un centro metálico (Seibert y col., 2005) necesario para su actividad catalítica. Una proteína perteneciente a esta gran familia de enzimas está fuertemente inducida en los cultivos de 30°C, se trata de una amidohidrolasa periplásmica con dominio ureasa (nº mancha 492), implicada en el metabolismo de aminoácidos y

nucleótidos (Holm y col., 1997). Además, una de las proteínas con mayor aumento de expresión (35,13) en *S. oneidensis* a 30°C es la enzima inositol-5-monofosfato hidrogenada (IMPDH) (nº mancha 557) que cataliza la conversión de inositol monofosfato en xantosina monofosfato con la consiguiente reducción de NAD a NADH, reacción que supone el paso limitante en la biosíntesis de nucleótidos de guanina (Zhou y col., 1997). Esa enzima contienen un dominio conservado evolutivamente denominado cistation-beta-sintasa (CBS) o domino Bateman, cuya función es la de coordinar y regular la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos de purina siendo esencial para mantener los niveles adecuados de ATP y GTP en *E. coli* (Pimkim y col, 2008). La disminución de los niveles intracelulares de nucleótidos de guanina tiene un fuerte efecto negativo en la proliferación celular (Pankiewicz y col., 2003) lo que podría estar indicándonos que su inducción a 30°C en *S. oneidensis* se debe a una necesidad por aumentar esta proliferación.

En cuanto a proteínas de membrana y proteínas relacionadas con el transporte a través de ella encontramos un aumento de expresión a 30°C de la porina de membrana externa (Omp) (nº mancha 856), que forma canales hidrofílicos en la membrana y, además, ha sido descrito que la chaperona GroEL es capaz de replegarla restaurando su actividad (Goulhen y col. 2004); también aumentan otras proteínas como la flagelina (nº mancha 993), un transportador ABC de hierro (III) (nº mancha 930) y la proteína SO_4719 (nº mancha 1236).

En ambientes donde las condiciones son cambiantes la capacidad de trasladarse activamente y de manera relativamente rápida a ambientes más favorables supone una importante ventaja en la supervivencia y la propagación (Wu y col, 2011; Bubendorfer y col., 2013). Muchas bacterias son móviles gracias al flagelo que proporciona una eficiente locomoción a través de líquidos, medios viscosos y superficies (Daniels y col., 2004). Es importante en la formación de biofilms, en la

Discusión

reducción de metales insolubles (Wu y col., 2011) y, en algunas bacterias, posee un papel en la autorregulación y la regulación de otros genes y, también, funciona como un sensor ambiental (Anderson y col., 2010). El sistema flagelar consiste en tres partes: el filamento, formado por proteínas flagelinas, el cuerpo basal y el gancho que conecta a ambos (Bubendorfer y col., 2013). Se sabe que *S. oneidensis* posee dos tipos de sistemas estáticos sobre los que se establece la rotación del flagelo y que se expresan simultáneamente, uno de ellos está formado por las proteínas OmpAB (Paullick y col., 2009) relacionadas con el movimiento rotacional del flagelo (Fukuoka y col., 2009; Paullick y col., 2009). Además, en esta especie está descrita la aparición de estructuras tipo 'pili' o flagelares, que conectan unas células con otras cuando los cultivos se transfieren de bajas (3°C) a altas (22°C) temperaturas (Abboud y col., 2005).

Los niveles de varias chaperonas con funciones de respuesta a estrés están incrementados en los cultivos de *S. oneidensis* a 30°C: la proteína ClpB (nº mancha 152), y las chaperonas DnaK (nº mancha 244) y GroEL (nº mancha 420). La proteína ClpB pertenece a la familia Hsp100/Clp AAA+ ATPasa y, a diferencia de su homóloga ClpA no se asocia con peptidasas sino que coopera con el sistema de chaperonas como DnaK/DnaJ/GrpE en una eficiente solubilización y reactivación de agregados proteicos aberrantes formados como consecuencia de estrés celular por calor (Kedzierska y col., 2003; Mogk y col., 2003; Lee y col., 2004; Doyle y col., 2007). Además, GroEL es una chaperona que también, junto a las anteriores, incrementa la solubilización de los agregados (Niwa y col., 2012).

La proteína de estrés universal (Usp) (nº mancha 1620) es una pequeña proteína citoplasmática conservada y presente en arqueas, bacterias, hongos y plantas (Kvint y col., 2003) y fuertemente inducida en muchas bacterias, como *E. coli* entre otras, como respuesta a un amplio rango de condiciones ambientales y situaciones de estrés como el choque térmico, falta de nutrientes, frente a agentes estresantes que impidan el

crecimiento celular y agentes que dañan el ADN (Tkaczuk y col., 2013). Esta proteína incrementa la tasa de supervivencia celular durante la exposición prolongada a este tipo de condiciones estresantes y es fosforilada cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento (Sousa y col., 2001). En los cultivos de *S. oneidensis* a 30°C aparece marcadamente inducida haciendo pensar que el crecimiento a esta temperatura supone, realmente, una situación de estrés para esta especie.

El factor de elongación Tu (EF-Tu) (nº mancha 643) es altamente inducido en el crecimiento de *S. oneidensis* a 30°C. Este factor está implicado en la unión y transporte del aminoacil-ARNt en el ribosoma durante la fase de elongación de la cadena peptídica en el proceso de biosíntesis de proteínas (Caldas y col., 1998). En bacterias mesófilas y termófilas como *E. coli* y *Bacillus stearothermophilus*, respectivamente, se ha visto una correlación entre la diferencia de grados centígrados en las temperaturas óptimas de crecimiento de cada especie y las diferencia de temperatura entre la termoestabilidad y, por tanto, mantenimiento de su actividad, de sus EF-Tu (Sanderová y col., 2004). Además, el EF-Tu también desempeña funciones como chaperona descritas en *E. coli* de manera que interacciona con las proteínas desnaturalizadas y desplegadas tras una situación de estrés por calor, previene su agregación, las repliega correctamente y estimula su renaturalización, y lo hace de manera mucho más eficiente desde su forma defosforilada EF-Tu-GDP (Caldas y col., 1998).

Los resultados observados sugieren que a bajas temperaturas, alejadas de su temperatura óptima de crecimiento, se está produciendo una situación de estrés oxidativo para *S. oneidensis*. Varias proteínas con un importante papel en la defensa frente a este tipo de estrés aparecen sobre expresadas a 4°C probablemente debido a que las bajas temperaturas provocan mayor solubilidad del oxígeno y un aumento de estabilidad de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Piette y col., 2011). Además, encontramos bastante activo el metabolismo del hierro y la inducción de distintas proteínas encargadas de regular su homeostasis. En relación a este aumento en la

Discusión

homeostasis del hierro se sobre expresan varias proteínas de membrana relacionadas con el transporte de este ión. Podríamos pensar que derivado del estrés oxidativo que *S. oneidensis* sufre a 4°C y debido tanto al efecto degenerativo de este estrés sobre las proteínas como de la necesidad de hacerle frente con enzimas y transportadores que regulen la concentración intracelular de los productos oxidantes, los procesos de síntesis y también de degradación de proteínas están bastante activos (inducción de factores de elongación y peptidasas). Se establecería una necesidad de recambio de proteínas para remodelar la fluidez de la membrana.

Sin embargo, y a pesar de que *S. oneidensis* está clasificada como una bacteria mesófila con una temperatura óptima de crecimiento de 30°C, el análisis de su proteoma de las células cultivadas a esta temperatura parece revelar una situación molecular de estrés térmico. Aparece un mayor número de proteínas chaperonas, de choque térmico, como DnaK, GroEL y Usp. Además, el factor EF-Tu, inestable en otras especies a altas temperaturas, presumiblemente está desempeñando aquí su función chaperona descrita en *E. coli*. Y encontramos también sobre expresión del sistema de proteasas asociado a chaperonas ClpB. El hecho de que a 30°C aumenten los niveles de proteínas que forman parte del flagelo bacteriano como la flagelina y la Omp nos hace pensar que esta temperatura cálida resulta relativamente estresante y que en su habitat natural *S. oneidensis* utiliza estas estructuras flagelares para desplazarse a ambientes menos cálidos.

5. Mecanismos moleculares de adaptación en *Psychrobacter frigidicola* dependientes de la temperatura.

5. 1. Aumento en la expresión de proteínas a bajas temperaturas

La actividad celular de la bacteria *P. frigidicola* en los cultivos de 4°C es bastante notable reflejándose un metabolismo activo en la inducción de proteínas implicadas en los procesos de biosíntesis de numerosos aminoácidos y nucleótidos así como en el metabolismo de carbohidratos (tabla R24). En los experimentos de DIGE se observa una sobre expresión a esta temperatura de las proteínas: componente E1 de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (nº mancha 44), la arginosuccinato sintasa (nº mancha 373), gamma-glutamil quinasa (nº mancha 421), fosforribosil formilglicina sintasa (nº mancha 19), carbamil fosfato sintasa (nº mancha 27), CTP sintasa (nº mancha 247) y acil-coA deshidrogenasa (nº mancha 481). Además, varios factores y proteínas involucradas en procesos de síntesis y traducción de otras proteínas también aparecen inducidos en esta bacteria a 4°C: una fosforribosil transferasa (nº mancha 417), fenilalanil ARNt sintetasa (nº mancha 540), la proteína TypA de unión a GTP (nº mancha 171) y el factor de elongación Tu (nº mancha 431).

Entre las más fuertemente inducidas a 4°C se encuentran la citosina trifosfato sintasa o sintetasa (CTP sintetasa) encargada de producir CTP a partir de UTP y glutamina y de regular los niveles intracelulares de CTP por medio de su interacción con los cuatro ribonucleótidos trifosfato (Endrizzi y col., 2004). Ha sido descrita y caracterizada en diferentes especies bacterianas *Lactococcus lactis* (Wadskov-Hansen y col., 2001), *E. coli* (Endrizzi y col., 2004), *Thermus thermophilum* (Goto y col., 2004) y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Yang y col., 1994) presentando en todas ellas propiedades enzimáticas muy similares (Han y col., 2005). Esta enzima citosólica es inducida por fosforilación y su producto, los CTP, son precursores esenciales de los fosfolípidos de membrana (Chang y col., 2008). Tiene un papel fundamental en el metabolismo de las

Discusión

pirimidinas y gran importancia en la tasa de crecimiento, en la concentración de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos (Jørgensen y col., 2004).

Otra enzima con gran aumento de expresión en las muestras de *P. frigidicola* a 4°C es la proteína similar a la enzima acil-CoA deshidrogenasa (nº mancha 481). Pertenece a la familia de flavoproteínas que catalizan la alfa-beta-deshidrogenación de los conjugados de acil-CoA (Ghisla y col., 2004). Esta familia de proteínas está implicada en la oxidación de lípidos, en el metabolismo de aminoácidos y actúa como una oxidorreductasa para la transferencia de electrones en la cadena respiratoria (Kim y col., 2004). Además se ha descrito su inducción en la respuesta a estrés por escasez de nutrientes en la bacteria *Salmonella typhimurium* (Spector y col., 1999). El aumento de todos estos procesos en los cultivos de 4°C puede estar relacionado con el hecho de que el metabolismo de esta bacteria psicrófila está notablemente activo a bajas temperaturas. Además, contribuye a la generación de energía y transferencia de electrones en la respiración debido la participación de la acetil-CoA, producto de la reacción catalizada por la acil-CoA deshidrogenasa (ACDH), en las rutas metabólicas como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Probablemente debido a este metabolismo activo en los cultivos de *P. frigidicola* a 4°C se requiere una elevada síntesis y presencia de cofactores NAD implicados en los principales procesos metabólicos (Gerdes y col., 2006) por ello, a esta temperatura, encontramos una fuerte inducción de la enzima nicotina-fosforribosil transferasa (nº mancha 417) que cataliza la primera reacción en la síntesis de NAD (Dulyaninova y col., 2000).

Tres proteínas implicadas en el proceso de traducción tienen sus niveles incrementados en *P. frigidicola* a 4°C: la subunidad alfa de la fenilalanil-ARNt-sintetasa (Phe-RS) (mancha nº 540), el factor de elongación Tu (mancha nº 431) y la proteína tirosina fosforilada A (TypA/BipA) de unión a GTP (mancha nº 172). Estas tres

proteínas interaccionan en la traducción para llevar a cabo su función de manera que la aminoacil-ARNt-sintetasa (fenilalanil en este caso) cataliza la unión del aminoácido a su correspondiente ARNt, concretamente, la Phe-RS, es una de las aminoacil-ARNt-sintetasa más complejas formadas por dos subunidades alfa y dos beta (Goldgur y col., 1997). EF-Tu cataliza la unión del aminoacil-ARNt creado al sitio A del ribosoma (Masullo y col., 2000) y la proteína TypA o BipA de unión a GTP cataliza la translocación del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P del ribosoma para completar el ciclo de elongación por su actividad GTPasa, uniéndose al ribosoma por el mismo sitio que el EF-G (Owens y col., 2004).

BipA o TypA es una GTPasa universalmente conservada en procariotas, miembro de la familia de GTPasas junto al EF-G, que presenta diferentes asociaciones a los ribosomas en respuesta a situaciones de estrés (deLivron y col., 2009). Esta proteína es requerida en el crecimiento a bajas temperaturas, así como en ambientes ácidos, en *Sinorhizobium meliloti* (Kiss y col., 2004) y en *E. coli* (Pfennig y col., 2001). También ha sido descrita en especies extremófilas como *Psychrobacter cryohalolentis* y *Thiomicrospira crunogena* regulando diferentes funciones entre las que se encuentra el crecimiento a bajas temperaturas aumentando la eficiencia de la traducción (Krishnnan y col., 2008).

El EF-Tu es una proteína multifuncional que además de catalizar la unión del aminoacil-ARNt al ribosoma puede actuar como chaperona en la renaturalización de otras proteínas (Masullo y col., 2000).

5. 2. Aumento en la expresión de proteínas a altas temperaturas

Varias proteínas relacionadas con el metabolismo redox aparecen sobre expresadas en las muestras de *P. frigidicola* a 30°C: la subunidad K de la NADH quinona oxidorreductasa (nº mancha 1289), uroporfirinógeno descarboxilasa (nº mancha 645), la proteína Pcryo_1545 (nº mancha 1036) y una glioxilasa (nº mancha 980). Son enzimas oxido y nitrorreductasas que catalizan la degradación de compuestos

Discusión

aromáticos, especies reactivas del oxígeno y radicales libres. La proteína Pcryo_1545 pertenece a la familia de las nitrorreductasas (Copeland y col., 2006) que catalizan la reducción de los componentes nitroaromáticos, tóxicos para las células (Liochev y col., 1999). En la aclimatación de la bacteria *Aquiflexum sp.* DL6 a un medio rico en compuestos nitroaromáticos este tipo de enzimas están muy inducidas produciéndose su actividad óptima a 40°C (Misal y col., 2013). Otros estudios llevados a cabo en *E. coli* destacan la contribución de las nitrorreductasas en la defensa frente al estrés oxidativo por medio de la disminución del ciclo redox y la reducción de compuestos nitroaromáticos y quinonas (Liochev y col., 1999). La glioxilasa, con un dominio dioxigenasa y un centro activo de unión a metal, juega un importante papel en la ruta de detoxificación de eucariotas, hongos y bacterias (Sukdeo y col., 2004). En algunos procariotas esta enzima protege frente al daño celular causado sobre las proteínas y los ácidos nucleicos por el metilglioxilato que se genera cuando hay una situación de escasez de fósforo (Vickers y col., 2004). Además, se sabe que diferentes situaciones de estrés inducen esta proteína en todo tipo de organismos y en algunas bacterias lo hacen debido a una acumulación de glicerol, un amortiguador térmico, por un aumento de la glicolisis durante el estrés.

Algunas proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, especialmente peptidasas y aminotransferasas que regulan el intercambio celular de proteínas, aparecen inducidas a 30°C en *P. frigidicola*: leucin-aminopeptidasa (nº mancha 233), la peptidasa M20D (nº mancha 523), dos aminotransferasas (nº mancha 705 y 618), la proteína inosina-5-monofosfato deshidrogenasa (nº mancha 337) y la endorribonucleasa L-PSP (nº mancha 1253). Esta endorribonucleasa pertenece a la familia de proteínas altamente conservada y extendida a bacterias, arqueas y eucariotas denominada, por su dominio activo, YjgF/YER057c/UK114 (Burman y col., 2007). Prácticamente ningún miembro de esta familia ha sido caracterizado hasta el punto de conocer claramente su función, sin embargo, algunos estudios señalan su

relación con el metabolismo de la isoleucina (Enos-Berlage y col., 1998; Christopherson y col., 2008) y la regulación de la biosíntesis de purinas (Schmitz y col., 2004). Se ha descrito, también, su capacidad antiproliferativa conduciendo a la senescencia celular mediante la degradación de proteínas ribosomales en células eucariotas (Andersen y col., 2009).

La peptidasa M20D es una metalopeptidasa con diversas funciones en todos los organismos. Está principalmente involucrada en la hidrólisis de productos derivados de la degradación de proteínas pero también en la maduración de éstas y en control del ciclo celular (Chen y col., 2008). Pertenece a la superfamilia de amidohidrolasas y a la subfamilia de aminocilinas con diversas funciones como la degradación de aminoácidos acetilados generados a partir de la degradación de proteínas, pero también están implicadas en la ruta de biosíntesis de ciertos aminoácidos y poseen función dipeptidasa en diversas especies bacterianas (Lindner y col., 2003).

Implicada en el metabolismo de nucleótidos aparece inducida la enzima inosina-5-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (nº mancha 337), encontrada también a 30°C en *S. oneidensis*. Actúa en la biosíntesis de nucleótidos de guanina generando la reducción de NAD a NADH (Zhou y col., 1997) y se ha señalado su papel como regulador de los niveles de ATP y GTP en *E. coli* (Pimkim y col., 2008). Su inducción podría ser una respuesta celular para promover la proliferación debido a que se ha descrito un efecto negativo sobre ella cuando disminuyen sus niveles intracelulares (Pankiewicz y col., 2003).

Encontramos una proteína de membrana fuertemente inducida, la porina (nº mancha 584) que forma canales acuosos hidrofílicos en la membrana para el transporte de pequeñas moléculas. Las porinas controlan el flujo de moléculas a través de la membrana permitiendo la entrada pasiva de moléculas hidrofóbicas, regulan el intercambio de nutrientes en las bacterias Gram-negativas e inducen rutas de señalización (Galdiero y col., 2012). Perteneciente a la amplia familia de las proteínas de membrana externa (Omp) este tipo de proteínas son sustrato de proteasas y

Discusión

chaperonas periplásmicas que actúan sobre ellas como factores de control de calidad (Gill y col., 2000; Walsh y col., 2003; Wu y col., 2011; Huston y col., 2011) y en su ensamblaje (Remaut y col., 2008). Además, se ha descrito su inducción por diferentes tipos de estrés (calor, falta de nutrientes, acidez) (Ozkanca y col., 2002; Begic y col., 2006); y como consecuencia de la inducción de algunas Hsp (Aich y col., 2012).

El mayor número de proteínas identificadas en nuestros experimentos de DIGE en las muestras procedentes de cultivos de *P. frigidicola* a 30°C pertenecen al grupo denominado como chaperonas y de estrés. Aparecen varias proteínas implicadas en la resistencia al estrés oxidativo: dos isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (nº manchas 993 y 996), la proteína tiorredoxina (nº mancha 1301) y la ferritina (nº mancha 1126). Por otro lado numerosas proteínas chaperonas, especialmente de respuesta a estrés térmico, también son inducidas a 30°C en esta bacteria psicrófila: el factor de inducción (TF) (nº mancha 359), proteína GrpE (nº mancha 1081), la chaperonina GroES (nº mancha 1326), una peptidil-prolil transisomerasa (nº mancha 1438) y la ATPasa AAA-2 (nº mancha 76).

La ferritina pertenece a la familia de las proteínas Dps con actividad ferroxidasa y de captación de hierro están implicadas en la resistencia al estrés oxidativo (Smith, 2004; Calhoun y col., 2011). La tiorredoxina es una proteína multifuncional altamente conservada que desempeña un papel principal en el mantenimiento del estado redox de la célula y la protege frente al estrés oxidativo (Lu y col., 2013; Wang y col., 2013). En la bacteria antártica *Pseudoalteromonas* sp. AN178 se ha establecido una temperatura óptima de actividad para esta enzima de 25°C (Wang y col., 2013) y estudios sobre sus propiedades en *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 la han establecido como la enzima más termoestable y resistente al calor descrita en psicrófilos (Falasca y col., 2012).

Las superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que catalizan la degradación de radicales superóxido (Pedersen y col., 2009; Merlino y col., 2010).

Estudios comparativos de esta enzima entre una bacteria adaptada al frío, *Aliivibrio salmonicida*, y *E. coli* han concluido que, a pesar de tener una menor termoestabilidad en la especie psicrófila que en la mesófila, la temperatura a la que permanece estable es significativamente mayor que la temperatura óptima de crecimiento del organismo (Pedersen y col., 2009) lo que concuerda con nuestros resultados a 30°C y con lo descrito en la psicrófila *P. halokplantis* donde la estabilidad de esta enzima está considerablemente por encima de la temperatura máxima de crecimiento de la bacteria (Castellano y col., 2006). A pesar de que se ha demostrado la asociación entre las bajas temperaturas y el estrés oxidativo (Chattopadhyay y col., 2011) la comparación del proteoma de la bacteria antártica *P. haloplanktis* TAC125 a partir de cultivos a 4°C y 18°C revela que a pesar de esta continua exposición de los psicrófilos a especies reactivas del oxígeno (ROS) que son estables a bajas temperaturas, en general el metabolismo aerobio de las bacterias antárticas está estimulado a temperaturas moderadas como 18°C originando también la producción de ROS (Piette y col., 2011). Probablemente por el efecto del presumible daño oxidativo que *P. frigidicola* está sufriendo a 30°C, pero también por efecto directo de la temperatura sobre la estabilidad y estructura de otras proteínas, encontramos a esta temperatura, todo un sistema de chaperonas implicadas en el plegamiento de proteínas y disolución de agregados aberrantes ampliamente estudiado. La peptidil-prolil isomerasa, una cilofilina, acelera el plegamiento de proteínas catalizando la isomerización de prolina en los enlaces peptídicos (Stamnes y col., 1992) y puede actuar como una chaperona (Wang y col., 2005). La ATPasa AAA-2 pertenece a la familia de ATPasas asociadas a varias actividades celulares (AAA) y desempeña numerosas funciones entre las que se encuentran la degradación de agregados y la estabilización en el plegamiento de proteínas, por lo cual, actúan como chaperonas en numerosos organismos (Ogura y col., 2001; Iyer y col., 2004; Snider y col., 2008; Biter y col., 2012).

A esta familia pertenecen diversas proteínas de choque térmico y proteasas como la subfamilia Clp/Hsp100 (Lee y col., 2004). En muchas ocasiones éstas interaccionan

Discusión

con otras chaperonas de la familia Hsp70/Hsp40 (Sielaff y col., 2010) a la que pertenece el cofactor GrpE (Langer y col., 1992) encargado del intercambio de ADP por ATP (Bonomo y col., 2010) que a su vez coopera con el sistema formado por GroEL/GroES y el factor de inducción TF ampliamente descrito en *P. frigidicola* donde exhibe, además, actividad peptidil-prolil isomerasa (Robin y col., 2009) y en *P. haloplanktis* TAC125 donde se ha señalado su fuerte dependencia de la temperatura de manera que es inducido a temperaturas moderadamente cálidas (18°C-33°C) (Piette y col., 2010). En *P. frigidicola* el TF, a diferencia de otras bacterias, es una chaperona monomérica que podría actuar de manera independiente a otras chaperonas (Robin y col., 2009).

La inducción de los procesos de traducción y síntesis están reflejados en el aumento de expresión de proteínas como la pterina dehidratasa o coactivador transcripcional (nº mancha 1353), desempeña dos funciones como activador transcripcional y como enzima metabólica (Cronk y col., 1996; Naponelli y col., 2008); el factor de reciclaje ribosomal (nº mancha 1437), responsable de la separación de los ribosomas del ARNm al final de la biosíntesis de proteínas, incrementa la eficiencia de la traducción reciclando los ribosomas de un ciclo al siguiente (Hirokawa y col., 2002) y resulta esencial para el crecimiento bacteriano (Janosi y col., 1994). En la bacteria patogénica *Brucella melitensis* juega un papel destacado como proteína de choque térmico (Teixeira-Gomes y col., 2000). Por último, hay una inducción del factor de elongación Ts (EF-Ts) (nº mancha 816) cuya función es la de intercambiador de nucleótidos de guanina para el EF-Tu, por su actividad GTPasa, para la separación del complejo EF-Tu-GDP del ribosoma (Palmer y col., 2013). Posee una elevada similitud en diferentes organismos mesófilos como *E. coli*, termófilos, como *Thermus thermophilus* y psicrófilos como *P. halokplantis* pero aparece en mayor concentración en esta última bacteria (Raimo y col., 2004). También se ha propuesto para el EF-Ts una función

chaperona en el ensamblaje y mantenimiento de la ARN polimerasa del virus Q β en en células infectadas (Takeshita y col., 2010).

A la vista de los resultados y teniendo presente que la temperatura óptima de crecimiento descrita para *P. frigidicola* es de entre 15°C y 18°C podemos deducir como esperable el hecho de que encontramos la inducción de un mayor número de proteínas de respuesta a estrés a 30°C que a 4°C. Se trata de una bacteria psicrófila evolutivamente adaptada al crecimiento a bajas temperaturas en su hábitat natural.

En su adaptación a las bajas temperaturas esta bacteria parece mantener un metabolismo bastante activo sobre expresando varias proteínas relacionadas con los procesos de biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos y con el metabolismo de carbohidratos, con una especial implicación en el metabolismo de las pirimidinas y el crecimiento celular, como es la CTP sintasa (Jørgensen y col., 2004). El aumento de expresión de proteínas como nicotina-fosforribosil transferasa que responde a la demanda de cofactores NAD (Dulyaninova y col., 2000) y la acil-CoA deshidrogenasa que aumenta los niveles de acetil-CoA (Ghisla y col., 2004) también nos hace pensar en el hecho de que la actividad celular de esta bacteria a bajas temperaturas permanece elevada.

Tres proteínas implicadas en el proceso de traducción tienen sus niveles incrementados en *P. frigidicola* a 4°C, la subunidad alfa de la Phe-RS, el EF-Tu y la TypA formando juntas la maquinaria necesaria para la traducción de proteínas (Owens y col., 2004).

En su aclimatación para el crecimiento a 30°C *P. frigidicola* eleva los niveles de, principalmente, nitro y oxidorreductasas y diferentes familias de chaperonas como las Hsp y miembros del sistema proteasa-chaperona Clp. Probablemente la regulación que ejercen estas proteínas frente al estrés térmico que supone el crecimiento a altas

temperaturas para esta bacteria psicrófila consigue mantener activo el metabolismo y la multiplicación celular, algo reflejado en la sobre expresión de proteínas de síntesis de nucleótidos así como peptidasas y transferasas que contribuyen al recambio de aminoácidos. Además, estos procesos metabólicos pueden derivar en la generación de ROS (Piette y col., 2011) induciendo la síntesis y expresión de proteínas del metabolismo redox que degraden estos productos tóxicos.

Parece, por tanto, que aunque el crecimiento para esta bacteria a 30°C supone una situación de estrés posee varios mecanismos moleculares con los que hacerle frente de manera satisfactoria.

6. Visión global de las proteínas que intervienen en la adaptación a la temperatura en *S. frigidimarina* respecto a *S. oneidensis* y *P. frigidicola*.

Varias proteínas sobre expresadas en los cultivos de 4°C y 30°C en la especie mesófila *S. oneidensis* y *P. frigidicola* son comunes a las encontradas en *S. frigidimarina*. Esta especie psicrotolerante comparte mecanismos de adaptación a la temperatura con bacterias mesófilas de su mismo género como *S. oneidensis* y con bacterias de distinto género pero adaptadas a un ambiente muy similar, la psicrófila *P. frigidicola* (figura R20).

Estas tres bacterias, aún perteneciendo a diferentes grupos de clasificación desde el punto de vista de su temperatura óptima de crecimiento, activan todo un sistema de respuesta a estrés en el desarrollo a 30°C reflejado en la inducción de Hsps, el sistema de pares proteasa-chaperona Clp, que suelen actuar en colaboración (Doyle y col., 2007), y de proteínas antioxidantes.

S. frigidimarina utiliza, en la respuesta al estrés, un juego de proteínas más parecido al utilizado por *P. frigidicola*. Aunque las chaperonas GroEL y DnaK no han sido identificadas en nuestros experimentos de DIGE en *P. frigidicola*, otros experimentos complementarios como la inmunodetección con anticuerpos específicos (figura R10) sí detectan un aumento de expresión a 30°C.

En cuanto al estrés oxidativo, que suele darse con más facilidad a bajas temperaturas por la mayor estabilidad de las especies reactivas del oxígeno, *S. frigidimarina* comparte con las otras dos especies la inducción de la ferritina aunque a diferentes temperaturas ya que para la especie mesófila el mayor estrés oxidativo se da a 4°C mientras que para las bacterias psicrófila y psicrotolerante ocurre a 30°C, probablemente por los productos derivados de un elevado metabolismo en este tipo de bacterias a temperaturas entre moderadas y cálidas (Piette y col., 2011).

Es destacable, también, el aumento de expresión de la proteína alquil hidroperóxido reductasa en el crecimiento de *S. frigidimarina* a ambas temperaturas en las que encontramos, además, varias isoformas. Esta enzima está implicada en el metabolismo redox protegiendo a la célula frente a peróxidos (Storz G., 1999), también se induce frente a estrés osmótico y a cambios de temperatura tanto por elevación como por disminución en diferentes tipos bacterianos (Leblanc, 2003).

Con respecto a las proteínas inducidas relacionadas con la membrana celular, *S. frigidimarina* comparte mayor similitud con las estrategias adoptadas por *S. oneidensis*. Ambas sobre expresan a 30°C proteínas que forman parte del sistema flagelar y a 4°C canales y sideróforos que regulan el paso de iones. Sin embargo y a diferencia de la especie mesófila y la psicrófila estricta, proteínas de la familia de las porinas, algunas implicadas en el aparato basal del flagelo y otras formando canales acuosos de paso para pequeñas moléculas, se inducen a 4°C en *S. frigidimarina*.

Discusión

Las mayores diferencias desde el punto de vista de la estrategia empleada por cada bacteria estudiada en función de la temperatura de desarrollo se observa en lo referente a los procesos de traducción y replicación. En general están inducidos los mismos factores de elongación (EF-Tu, EF-Ts y EF-G) en las tres especies bacterianas pero lo hacen a diferentes temperaturas según la especie.

En varias especies psicrotolerantes de *Sphingobacterium* y *Pseudomonas*, que pueden crecer a temperaturas entre 0°C y 30°C, procedentes de la Antártida, se han observado diferencias en el estado de fosforilación-defosforilación de proteínas membranales y citosólicas como respuesta al aumento o disminución de la temperatura funcionando así como sensores térmicos celulares (Ray y col., 1994). La identificación de varias isoformas en numerosas proteínas de diferentes grupos funcionales (tabla D1.; figura D1.) en *S. frigidimarina*, y que no se observan ni en *S. oneidensis* ni en *P. frigidicola*, induce a pensar que esta bacteria psicrotolerante posee, principalmente, un mecanismo similar para el reconocimiento de las condiciones del medio y su adaptación a ellas probablemente por diferentes estados de fosforilación u otro tipo de modificaciones postraduccionales.

Tabla D1. Isoformas identificadas en *S. frigidimarina* a 4°C y 30°C.

Nº Mancha	Proteína identificada	Tª
2023	Alkyl hydroperoxide reductase (AHR)	4
1602	Alkyl hydroperoxide reductase (AHR)	4
2022	Alkyl hydroperoxide reductase (AHR)	30
1522	Alkyl hydroperoxide reductase (AHR)	30
1519	Alkyl hydroperoxide reductase (AHR)	30
2020	Alkaline phosphatase (AP)	4
411	Alkaline phosphatase (AP)	4
2019	Alkaline phosphatase (AP)	4
331	Alkaline phosphatase (AP)	4
328	Alkaline phosphatase (AP)	4
195	TonB-dependent siderophore receptor (TonB)	4
189	TonB-dependent siderophore receptor	4
188	TonB-dependent siderophore receptor	4
387	Chaperonin GroEL (GroEL)	30
374	Chaperonin GroEL (GroEL)	30
224	Chaperone protein DnaK (DnaK)	30
215	Chaperone protein DnaK (DnaK)	30
205	Chaperone protein DnaK (DnaK)	30
1773	Ferritin, Dps family protein (Ferritin)	30
1767	Ferritin, Dps family protein (Ferritin)	30
711	Elongation factor Tu (EF-Tu)	30
708	Elongation factor Tu (EF-Tu)	30
701	Elongation factor Tu (EF-Tu)	30
266	30S ribosomal protein S1 (S1)	30
258	30S ribosomal protein S1 (S1)	30

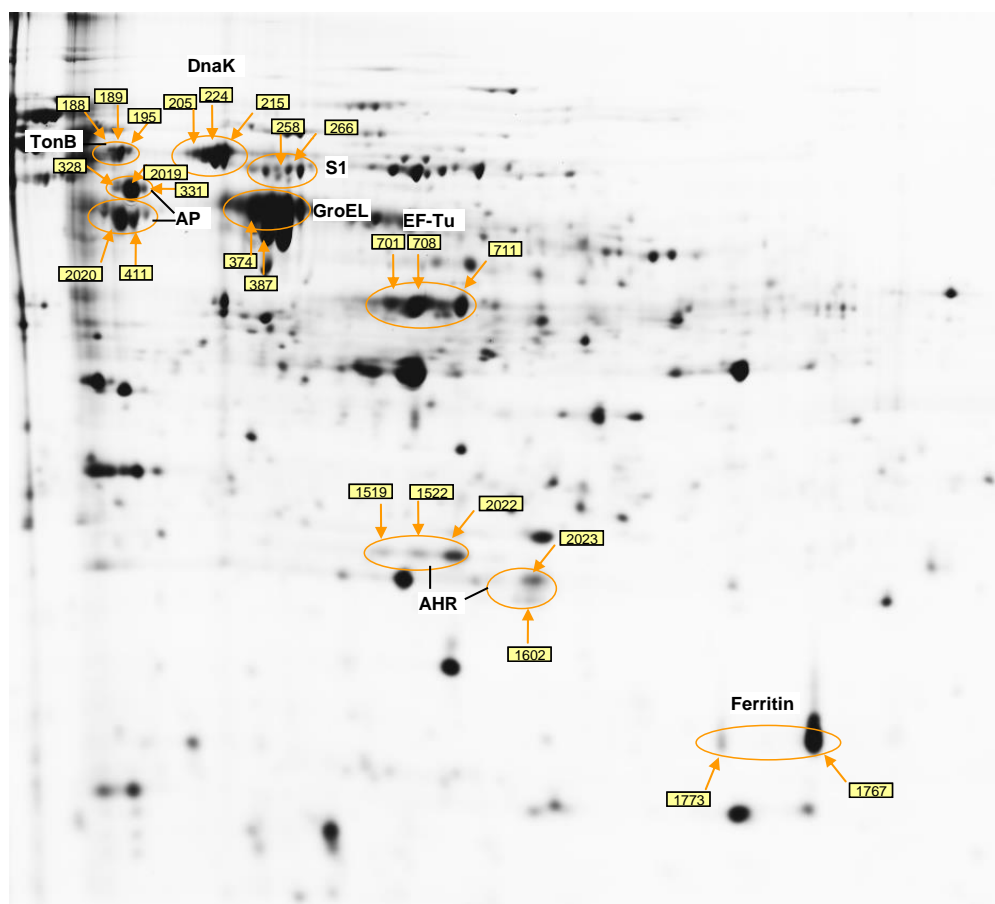


Figura D1. Diferentes isoformas de proteínas identificadas en *S. frigidimarina* en su adaptación a las temperaturas de crecimiento de 4°C y 30°C.

7. Reorganización de la maquinaria celular en función de la temperatura.

La interacción con el medio y con las diferentes condiciones ambientales en las que las bacterias tienen que desarrollarse, a menudo suponen un reto celular que pone en funcionamiento mecanismos en los que se involucra la acción conjunta de diferentes proteínas y procesos moleculares. Las células tienen, por tanto, la capacidad de responder a cambios ambientales como la temperatura, la presión, el estrés osmótico y la disponibilidad de oxígeno. La adaptación celular en respuesta a estas variaciones ocurre gracias a cambios en la tasa metabólica, en el pH intracelular, concentración de iones, composición de la membrana y en la expresión de genes que codifican las proteínas necesarias en cada caso (Thieringer y col., 1998).

Cuando *S. oneidensis*, *S. frigidimarina* y *P. frigidicola* son cultivadas a 30°C y 4°C la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos de las chaperonas GroEL y DnaK, revela interacciones de proteínas que podrían estar sucediendo in vivo en la célula como parte de una respuesta adaptativa a las diferentes temperaturas de crecimiento o como parte de su metabolismo normal a dichas temperaturas.

En *S. oneidensis* los procesos que parecen ocurrir simultáneamente a la actuación de las chaperonas GroEL y DnaK son bastante similares en ambas temperaturas de crecimiento de 4°C y 30°C (tablas R33, R34, R35 y R36).

Las chaperonas son componentes esenciales de la maquinaria de control de calidad en las células (Hartl y col., 2002). Optimizan las respuestas fisiológicas de las bacterias interaccionando directamente con otras proteínas, participando en la señalización celular y actuando como proteínas de respuesta a estrés. En este gran grupo de proteínas se encuentran las Hsp que han sido identificadas y caracterizadas

en numerosas bacterias y arqueas, donde generalmente actúa más de un sistema de Hsp simultáneamente (Laksanalamai y col., 2004).

Las Hsp GroEL y DnaK son las principales representantes de sus respectivas familias (Cooper y col., 2000; Beckerman, 2005; Libereck y col., 2008) y su acción ha sido descrita en un amplio rango de bacterias. Desempeñan funciones en el plegamiento de proteínas tanto sintetizadas de novo como en la reparación de proteínas desnaturalizadas así como la prevención y degradación de agregados proteicos aberrantes y en la señalización celular (Boulon y col., 2008; Boulon y col., 2010; Iki y col., 2010; Iwasaki y col., 2010) e incluso en la regulación de la transcripción y traducción (Parsot y col., 2003)). Por todo ello se ha demostrado que trabajan en conjunto. En las tres especies bacterianas estudiadas estas proteínas funcionan formando parte de complejos en los que interaccionan, de manera directa o indirecta, con otras proteínas para facilitar diversas respuestas fisiológicas de la célula frente a diferentes temperaturas de crecimiento.

Esta red de interacción de proteínas se compone principalmente de otras chaperonas y cochaperoninas (GroES, proteína universal de estrés), proteínas de membrana implicadas en el transporte de moléculas e iones (porinas y receptores dependientes de Ton-B) e implicadas en la formación de estructuras flagelares (flagelina, familia Omp), proteínas involucradas en la defensa frente al estrés oxidativo (alquil hidroperóxido reductasa, superóxido dismutasa) y los factores de elongación EF-Tu, EF-Ts y EF-G.

Además, mediante los geles desnaturalizantes (figura R21) se identificó, junto a la chaperona GroEL, al precursor de la subunidad flavoproteica de la fumarato reductasa, que es una oxidorreductasa y a una prolil oligopetidasa, implicada en el metabolismo de aminoácidos y señalización celular.

Discusión

En las muestras inmunoprecipitadas de cultivos de *P. frigidicola*, con un proteoma más sencillo que *S. oneidensis* y *S. frigidimarina*, se identifican un menor número de proteínas que podrían estar actuando junto a las chaperonas GroEL y DnaK pero parece repetirse cierto patrón por el que las proteínas de resistencia a telurio (TerD) y superóxido dismutasa aparecen con GroEL a ambas temperaturas y con DnaK a 30°C la primera y DnaK a 4°C la segunda.

La proteína TerD forma parte de una familia poco caracterizada implicada especialmente en la respuesta a estrés oxidativo (Chasteen y col., 2009) en varios organismos y está, además, presente en diferentes bacterias patógenas (Taylor, 1999). La presencia de esta enzima y de la superóxido dismutasa podría indicar una buena preparación de esta bacteria psicrófila ante la frecuente situación de estrés oxidativo que supone tanto el crecimiento a bajas temperaturas por la estabilidad de las especies reactivas del oxígeno (ROS) como por el resultado de los procesos metabólicos que pueden llevar a la generación de ROS a altas temperaturas (Piette y col., 2011).

En la bacteria psicrotolerante *S. frigidimarina* las proteínas que presumiblemente están interaccionando tanto con GroEL como con DnaK en la célula a 30°C y 4°C (tablas R37, R38, R39 y R40) son principalmente las mismas que aparecen inducidas a esas mismas temperaturas en los experimentos de DIGE. Esto coincide sobre todo en los cultivos de 4°C, donde fundamentalmente encontramos isoformas de la fosfatasa alcalina, proteínas de membrana implicadas en el intercambio de nutrientes e iones como la porina y diferentes componentes del sistema receptor dependiente de Ton-B así como proteínas de la superfamilia Omp, la enzima antioxidante alquil hidroperóxido reductasa y el factor de elongación Tu.

En el caso del crecimiento a 30°C (figuras R29 y R32) entre las proteínas que inmunoprecipitan con GroEL y DnaK hallamos tanto algunas inducidas a esta temperatura relacionadas con la respuesta a estrés como algunas no identificadas en

los experimentos de DIGE, lo cual nos hace suponer que poseen ciertos niveles basales en la célula de manera constitutiva como son la porina, el receptor dependiente de Ton-B y la proteína Tsx formadora de canales nucleósido específicos. Es destacable la identificación de las enzimas antioxidantes alquil hidropéroxido reductasa, a ambas temperaturas, y superóxido dismutasa, aunque ésta última no parece aumentar sus niveles de expresión a 30°C con respecto a los cultivos de 4°C. Involucrado en los procesos de replicación aparece el EF-Tu co-inmunoprecipitando con las chaperonas mencionadas.

En los cultivos tanto a 30°C como a 4°C encontramos las principales proteínas identificadas en los experimentos de DIGE donde se observa su inducción a una u otra temperatura. Esto nos hace suponer que la mayoría de ellas están sintetizadas de manera constitutiva en la célula de manera que cuando la situación ambiental lo requiera la bacteria aumenta sus niveles de expresión para adaptarse de un modo más o menos rápido a los cambios.

Para obtener una visión global de la maquinaria molecular que cada especie estudiada utiliza en función de la temperatura se estudiaron los complejos que forman las chaperonas GroEL y DnaK con otras proteínas con las que co-inmunoprecipitan. La representación mediante una variación del diagrama de Venn de las proteínas identificadas en estos complejos mediante espectrometría de masas se representa en la figura D2.

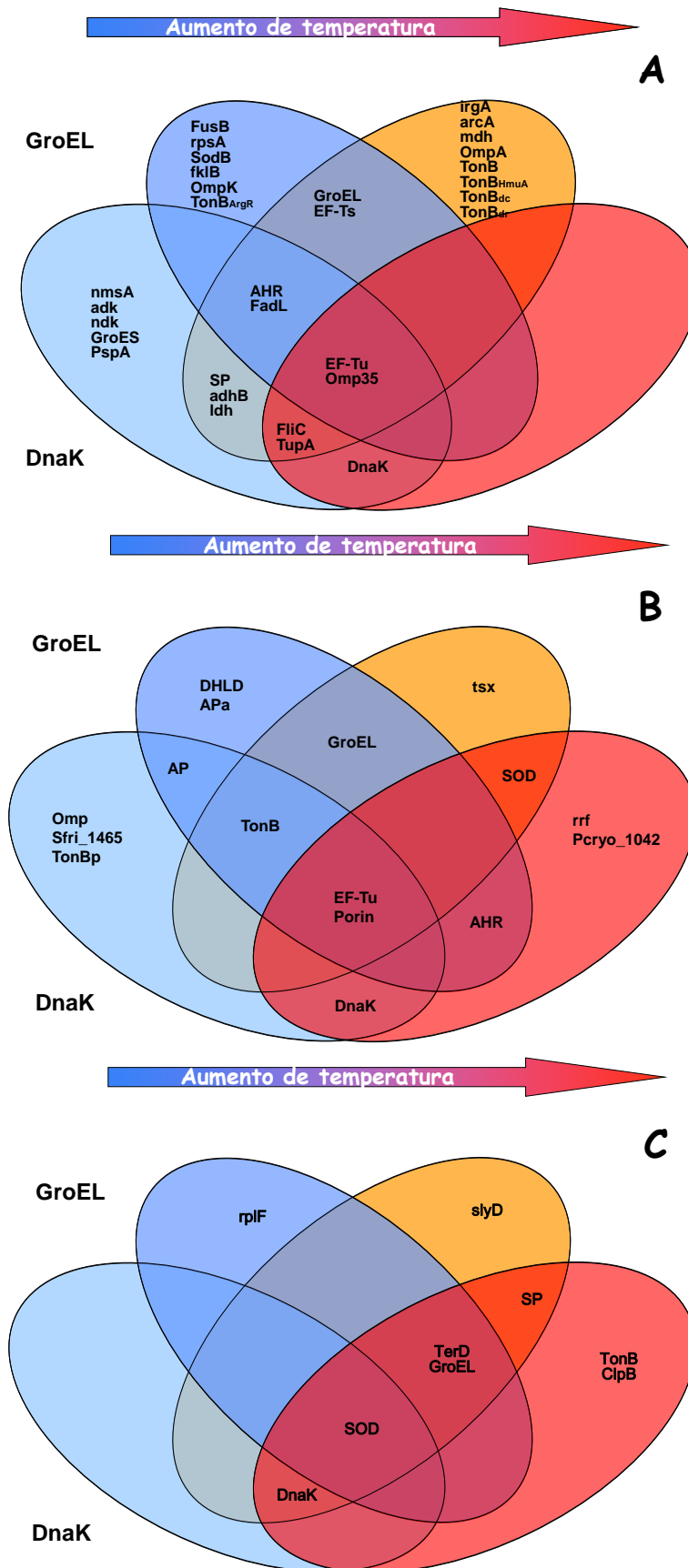


Figura D2. Diagramas de Venn agrupando las proteínas identificadas que co-inmunoprecipitan con GroEL y DnaK a 4°C (conjuntos azules) y 30°C (conjuntos naranja y rojo) en *S. oneidensis* (A), *S. frigidimarina* (B) y *P. frigidicola* (C).

Estas maquinarias son más complejas en *S. oneidensis* (figuras R22, R23, R25 y R26), marcadamente más sencillas en *P. frigidicola* (figuras R34, R35, R37 y R38) e intermedias, en cuanto a esta complejidad, en *S. frigidimarina* (figuras R28, R29, R31 y R32). Además, mientras en *S. oneidensis* las proteínas que co-inmunoprecipitan con GroEL y DnaK tienden a agruparse, en esta representación, entre temperaturas de moderadamente templadas a frías, las de *P. frigidicola* lo hacen fundamentalmente hacia las temperaturas cálidas y *S. frigidimarina* las distribuye de manera mucho más uniforme en todo el rango de conjuntos chaperona-temperatura establecidos. Lo que nos conduce a pensar, una vez más, que *S. frigidimarina* comparte mecanismos de adaptación a la temperatura con las otras dos especies estudiadas gracias al genoma, a las modificaciones postraduccionales y a las presiones ambientales. Y que como consecuencia está mejor adaptada a las variaciones térmicas y es más versátil en su adaptación en el rango de temperaturas 4°C-30°C.

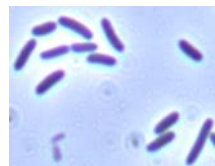
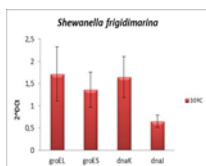
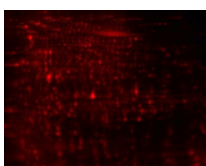
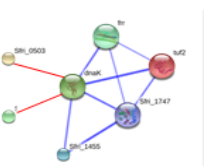
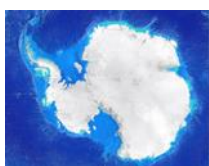
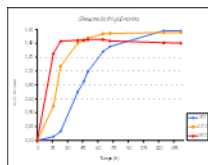
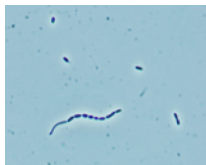
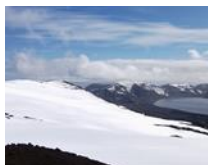
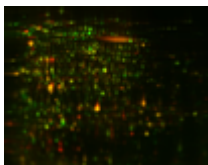
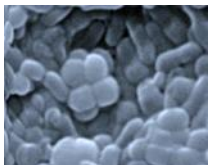
En conclusión el género *Shewanella* parece presentar una mayor versatilidad desde el punto de vista adaptativo que el género *Psychrobacter* lo que induce a postular que ha existido una adaptación y una evolución desde microorganismos mesófilos hacia psicrófilos manteniendo un genoma análogo.

Discusión

Abreviaturas de proteínas inmunoprecipitadas:

adhB	Alcohol dehydrogenase II	Pcryo1042	Hypothetical protein
adk	Adenylate kinase	Pcryo_1042	
AHR	Alkyl hydroperoxide reductase	PNPase	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
AP	Alkaline phosphatase	PspA	Hypothetical protein SO_3765
arcA	Two component response regulator	rplF	rplF gene product
ClpB	Chaperone protein ClpB	rpsA	rpsA gene product
DHLD	Dihydrolipoamide dehydrogenase	rrf	Ribosome recycling factor
EF-Ts	Elongation factor Ts	S1	30S ribosomal protein S1
EF-Tu	Elongation factor Tu	SCoA	Succinyl-CoA synthetase subunit
EF-Tu	Elongation factor Tu		beta
FadL	Outer membrane long-chain fatty acid receptor FadL family	slyD	slyD gene product
FATP	Long-chain fatty acid transport protein	SOD	Superoxide dismutase
flkB	flkB gene product	SodB	SodB gene product
FliC	Flagellin	SP	Stress protein
FusB	Elongation factor G2	TerD	Tellurium resistance protein TerD
irgA	Enterobactin receptor protein	TonB	TonB-dependent siderophore receptor
ldh	Leucine dehydrogenase	TonBHmuA	TonB-dependent heme/hemoglobin receptor HmuA
mdh	Malate dehydrogenase	TonB_{dc}	TonB- dependent receptor domain-containing protein
mmsA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	TonB_p	TonB- dependent receptor, putative
ndk	Nucleoside diphosphate kinase	TonB_{ArgR}	ArgR- regulated TonB-dependent receptor
Omp35	Outer membrane porin Omp35	TupA	Hypothetical protein SO_4719
OmpA	OmpA family protein		
OmpK	Outer membrane protein OmpK		

Conclusiones



1. El desarrollo de cultivos en función de la temperatura es muy similar en las tres especies estudiadas independientemente de su característica mesófila, psicrotolerante o psicrófila.
2. El crecimiento a 4°C ocurre de manera más lenta en las tres especies y alcanza valores de biomasa mayores que a 30°C donde el crecimiento se dispara tempranamente pero entra antes en la fase estacionaria.
3. Las chaperonas GroEL y DnaK aumentan notablemente su expresión en las tres bacterias estudiadas en el crecimiento de los cultivos a 30°C, indicando que el desarrollo en ambientes cálidos se traduce en una situación de estrés que requiere mayor presencia de estas proteínas en las tres especies.
4. La metodología empleada no ha detectado cambios significativos, entre las dos temperaturas de crecimiento, en los niveles de expresión génica de las chaperonas GroEL, GroES, DnaK y DnaJ en la especie mesófila *S. oneidensis* ni en la psicrotolerante del mismo género *S. frigidimarina*.
5. No se ha observado correlación entre los niveles de ARNm de los genes que codifican las chaperonas GroEL, GroES, DnaK y DnaJ y los niveles de estas proteínas en la célula a ninguna de las dos temperaturas ensayadas en *S. oneidensis* ni en *S. frigidimarina*.
6. El crecimiento a 4°C para *S. oneidensis* supone una situación de estrés oxidativo frente al que se defiende induciendo la expresión de proteínas antioxidantes, controlando el metabolismo y la homeostasis del hierro, provocando cambios membranales e incrementando el recambio de proteínas por elevación de los niveles de síntesis y degradación de las mismas.

Conclusiones

7. El crecimiento a 30°C para *S. oneidensis*, a pesar de estar descrito como el óptimo para esta bacteria, promueve la sobre expresión de un grupo de proteínas de respuesta al estrés térmico.
8. En el desarrollo de *P. frigidicola* a 4°C el metabolismo celular permanece notablemente activo a nivel de recambio de aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos y procesos de traducción mientras que a 30°C se establece una situación de estrés oxidativo y térmico que induce a proteínas nitro y oxidorreductasas y chaperonas, principalmente.
9. Tanto el crecimiento a 30°C como a 4°C provoca estrés oxidativo en *S. frigidimarina* frente al que responde con dos tipos diferentes de cambios metabólicos en función de la temperatura.
10. A diferencia de *S. oneidensis* y de *P. frigidicola* la especie psicotolerante *S. frigidimarina*, aunque comparte con ellas algunas de las principales proteínas inducidas a 4°C y 30°C, posee un mecanismo de adaptación a los cambios de temperatura regulado de manera preferiblemente post-traducciona con un elevado número de isoformas encontradas a las dos temperaturas.
11. GroEL y DnaK son parte fundamental de la maquinaria molecular de adaptación a la temperatura, forman complejos macromoleculares interaccionando con otras proteínas involucradas en la respuesta a estrés que están en la célula de manera constitutiva y aumentan su expresión, actuando de manera conjunta, frente a los cambios ambientales.

Abboud R., Popa R., Souza-Egipsy V., Giometti C. S., Tollaksen S., Mosher J. J., Findlay R. H. y Neilson K. H. (2005). Low-Temperature Growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 811-816.

Ahmad A., Bhattacharya A., McDonald R. A., Cordes M., Ellington B., Bertelsen E. B. y Zuiderweg E. R. (2011). Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface. *PNAS*. 108: 18966-18971.

Aich P., Patra M., Chatterjee A.K., Roy S. S. y Basu T. (2012). Calcium chloride made *E. coli* competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. *Protein J.*, 31: 366-73.

Alcazar A., Garcia-Descalzo L., Cid C. (2010). Microbial Evolution and Adaptation in Icy Worlds. Nova Science Publishers/Springer Verlag Inc., New York.

Albert A., Yunta C., Arranz R., Peña A., Salido E., Valpuesta J. M. y Martín-Benito J. (2010). Structure of GroEL in complex with an early folding intermediate of alanine glyoxylate aminotransferase. *J Biol Chem.*, 285: 6371-6.

Aldridge P., Karlinsey J. y Hughes K. T. (2003). The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL. *Mol Microbiol*, 49: 1333-1345.

Andersen J. B, Mazan-Mamczarz K., Zhan M., Gorospe M, y Hassel B. A. (2009). Ribosomal protein mRNAs are primary targets of regulation in RNase-L-induced senescence. *RNA Biol.*, 6: 305–315.

Anderson J. K., Smith T. G. y Hoover R. T. (2010). Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol.*, 18: 30.

Andrews S. C., Robinson A. K. y Rodriguez-Quinones F.: (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 215-237.

Angelaccio S. (2013). Extremophilic SHMTs: From structure to biotechnology. *Biomed research International*, 2013. 1-10.

Angell C. A. (1982). Supercooled water,. In *Water-a comprehensive treatise*, pp.1-82. Ed. F. Franks Plenum Press, New York.

Antelmann H., Engelmann S., Schmid R. y Hecker M. (1996). General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J Bacteriol.*, 178: 6571–6578.

Aslund F. y Beckwith J. (1999). Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell.*, 96: 751-3.

Azevedo J. S., Correia A. y Henriques I. (2013). Molecular analysis of the diversity of genus *Psychrobacter* present within a temperate estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 84: 451-60.

Bakermans C., Ayala-del-Río H. L., Ponder M. A., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M. F. y Tiedje J. M. (2006). *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1285–1291.

Barros J. A. y Morita R. Y. (1978). Microbial life at low temperatures: ecological aspects. In *Microbial life in extreme environments*. Ed. D. J. Kushner, pp. 9-71. London: Academic Press.

Beckerman M. (2005). Protein Folding and Binding. In *Molecular and Cellular Signaling*. pp. 89-110. Springer.

Begin S. y Worobec E. A. (2006). Regulation of *Serratia marcescens* ompF and ompC porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. *Microbiology*, 152: 485-91.

Bertelsen E. B., Chang L., Gestwicki J. E., Zuiderweg E. R. (2009). Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 8471-8476.

Biter A. B., Lee J., Sung N., Tsai F. T. y Leeb S. (2012). Functional Analysis of Conserved Cis- and Trans-elements in the Hsp104 Protein Disaggregating Machine. *J Struct Biol*, 179: 172-180.

Björn M. Burmann y Sebastian Hiller (2012). Solution NMR Studies of membrane-protein-chaperone complexes. *Chimia*. 66: 759-763.

Bogumil D. y Dagan T. (2012). Cumulative impact of chaperone-mediated holding on genome evolution. *Biochemistry*. 51: 9941-9953.

Bonomo J., Welsh J. P., Manthiram K., Swartz J. R. (2010). Comparing the functional properties of the Hsp70 chaperones, DnaK and BiP. *Biophys Chem*, 149: 58-66.

Boulon S., Marmier-Gourrier N., Pradet-Balade B., Wurth L., Verheggen C., Jady B.E., Rothe B., Pescia C., Robert M .C., Kiss T., Bardoni B., Krol A., Branlant C., Allmang C., Bertrand E., Charpentier B. (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* 180: 579–595.

Boulon S., Pradet-Balade B., Verheggen C., Molle D., Boireau S., Georgieva M., Azzag K., Robert M.C., Ahmad Y., Neel H., Lamond A.I., Bertrand E. (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell*, 39: 912–924.

Bowman J. P., Cavanagh J., Austin J. J. y Sanderson K. (1996). Novel *Psychrobacter* Species from Antarctic Ornithogenic Soils. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 1040-1047.

Bowman J. P., McCammon S. A., Nichols D. S., Skerratt J. H., Rea S. M., Nichols P. D. y McMeekin T. A. (1997). *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella figidimarina* sp. nov., Novel Antarctic Species with the Ability To Produce Eicosapentaenoic Acid (20:5 ω 3) and Grow Anaerobically by Dissimilatory Fe (III) Reduction. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 841-848.

Bowman J.P. (2006). The Genus *Psychrobacter*. *Prokaryotes*, 6: 920–930.

Brigé A., Van Den Hemel D., Carpentier W., De Smet L. y Jozef J. Van Beeumen J. J. (2006). Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from *Shewanella oneidensis* indicate differences in physiological function. *Biochem J.* 394: 335–344.

Brock T. D. y Freeze H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n., and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98: 289-297.

Brock, Madigan, Martinko, Parker. (2004). *Biología de los microorganismos*. (10ª edición). Ed. Pearson-Prentice-Hall, Madrid.

Bromfield E. G. y Nixon B. (2013). The function of chaperone proteins in the assemblage of protein complexes involved in gamete adhesion and fusion processes. *Reproduction*, 145: 31–42.

Bubendorfer S., Ishihara M., Dohlich K., Heiss C., Vogel J., Sastre F., Panico M., Hitchen P., Dell A., Azadi P. y Thormann K. M. (2013) Analyzing the Modification of the *Shewanella oneidensis* MR-1 Flagellar Filament. *PLoS One*, 8: e73444.

Bukau B. y Horwich A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92: 351–366.

Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D., Sutton G. G., Blake J. A., FitzGerald L. M., Clayton R. A., Gocayne J. D., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J. F., Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S. y Venter J. C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*. 273: 1058-1073.

Burman D. J., Stevenson C. E. M., Sawers R. G. y Lawson D. M. (2007). The crystal structure of *Escherichia coli* TdcF, a member of the highly conserved YjgF/YER057c/UK114 family. *BMC Struct Biol.*, 7: 30.

Caldas T., Laalami S. y Richarme G. (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J Biol Chem.*, 275: 855-60.

Caldas T. D., El Yaagoubi A. y Richarme G. (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J Biol Chem.*, 273: 11478-82.

Calhoun L. N. y Kwon Y. M. (2011). Structure, function and regulation of the DNA-binding proteína Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *J Appl Microbiol.*, 110: 375-386.

Castellano I., Di Maro A., Ruocco M. R., Chambery A., Parente A., Di Martino M. T., Parlato G., Masullo M. y DeVenditis E. (2006). Psychrophilic superoxide dismutase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*: biochemical characterization and identification of a highly reactive cysteine residue. *Biochimic*, 88: 1377-1389.

Cavicchioli R., Siddiqui K. S., Andrews D. y Sowers K. R. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol.*, 13: 253-61.

Chakrabarty A. M. (1998). Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signalling and polysaccharide synthesis. *Mol Microbiol.*, 28: 875-82.

Chakratvorty D., Shreshtha A. K., Sarath Babu V. R. y Patra S. (2013). Molecular Evolution of Extremophiles. En *Extremophiles: Sustainable and Biotechnological Implications*. Om V. Singh. Pp. 1-21. Wiley-Blackwell, New Jersey.

Chang Y. F. y Carman G. M. (2008). CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res.*, 47: 333-9.

Chasteen T. G., Fuentes D. E., Tantaleán J. C. y Vásquez C. C. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 33: 820-32.

Chattopadhyay M. K., Raghu G., Sharma Y. V. R. K., Biju A. R., Rajasekharan M. V., Shivaji S. (2011). Increase in Oxidative Stress at Low Temperature in an Antarctic Bacterium. *Current Microbiology*, 62: 544-546.

Chen G., Gharib T. G., Huang C. C., Taylor J. M., Misek D. E., Kardia S. L., Giordano T. J., Iannettoni M. D., Orringer M. B., Hanash S. M. y Beer D. G. (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics.*, 1: 304-13.

Chen S. L., Marino T., Fang W. H., Russo N. e Himo F. J. (2008). Peptide hydrolysis by the binuclear zinc enzyme aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*: a density functional theory study. *Phys Chem B.*, 112: 2494-500.

Chen J., Cheng C., Xia Y., Zhao H., Fang C., Shan Y., Wu B. y Fang W. (2011). Lmo0036, an ornithine and putrescine carbamoyltransferase in *Listeria monocytogenes*, participates in arginine deiminase and agmatine deiminase pathways and mediates acid tolerance. *Microbiology.*, 157: 3150-6.

Chittori S., Savithri H. S. y Murthy M. R. N. (2012). Structural and mechanistic investigations on *Salmonella typhimurium* acetate kinase (AckA): identification of a putative ligand binding pocket at the dimeric interface. *BMC Structural Biology*, 12: 1-15.

Christopherson M. R., Schmitz G. E. y Downs D. M. (2008). YjgF is required for isoleucine biosynthesis when *Salmonella enterica* is grown on pyruvate medium. *J Bacteriol*, 190: 3057-62.

Clausen T., Kaiser M., Huber R. y Ehrmann M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in proteína quality control. *Nat Rev Moll Cell Biol.*, 12: 152-162.

Cloutier P. y Coulombe B. (2013). Regulation of molecular chaperones through post-translational modifications: decrypting the chaperone code. *Biochim Biophys Acta.*, 1829: 443-54.

Coleman J.E. y Gettins P. (1983). Metal Ions in Biology. Spiro T.G., editor. vol. 5., p. 153-217. John Wiley and Sons, New York.

Coon S. L., Kotob S., Jarvis B. B., Wang S., Fuqua W. C. y Weiner R. M. (1994). Homogentisic acid is the product of MelA, which mediates melanogenesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana* D. *Appl Environ Microbiol.*, 60: 3006-10.

Cooper G. M. y Hausman R. E. (2000). Protein Folding and Processing. In *The Cell: A Molecular Approach*. Chapter 7. ASM Press. 2nd Ed.

Copeland A., Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter J. C., Glavina T., Hammon N., Israni S., Dalin E., Tice H., Pitluck S., Brettin T., Bruce D., Han C., Tapia R., Sims D. R., Gilna P., Schmutz J. y Richardson P. (2006). Complete sequence of chromosome of *Psychrobacter cryohalolentis* K5. US DOE Joint Genome Institute to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

Cox B., Kislinger T. y Emili A. (2005). Integrating gene and protein expression data: pattern analysis and profile mining. *Methods.*, 35: 303-14.

Cronk J. D., Endrizzi J. A. y Alber T. (1996). High-resolution structures of the bifunctional enzyme and transcriptional coactivator DCoH and its complex with a product analogue. *Protein Sci.*, 5: 1963-72.

D'Amico S., Collins T., Marx J., Feller G. y Gerday C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.*, 7: 385-389.

Daniels R., Vanderleyden J. y Michiels J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol/Rev.*, 28: 261-89.

Dariwin A. J. (2005). The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol.*, 57: 621-628.

De Lorenzo V. (2010). Genes that move the window of viability of life: Lessons from bacteria thriving at the cold extreme. *Bioessays*, 33: 38-42.

De Vendittis E., Castellano I., Cotugno R., Ruocco M. R., Raimo G. y Masullo M. (2007). Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition. *J Theor Biol.*, 7; 250: 156-71.

deLivron M. A., Makanji H. S., Lane M. C. y Robinson V. L. (2009). A novel domain in translational GTPase BipA mediates interaction with the 70S ribosome and influences GTP hydrolysis. *Biochemistry*, 48: 10533-41.

Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T., Mogk A. y Bukau B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature*, 400: 693-696.

Dikow R. B. (2011). Genome-level homology and phylogeny of *Shewanella* (Gammaproteobacteria: Iteromonadales: Shewanellaceae). *BMC Genomics*, 12: 237.

Dougan D. A., Reid B. G., Horwich A. L. y Bernd Bukau B. (2002). ClpS, a Substrate Modulator of the ClpAP Machine. *Molecular Cell*, 9: 673–683.

Doyle S. M., Hoskins J. R. y Wickner S. (2007). Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 11138-44.

Dulyaninova N. G, Podlepa E. M., Touloukhonova L. V. y Bykhovsky V. Y. (2000). Salvage pathway for NAD biosynthesis in *Brevibacterium ammoniagenes*: regulatory properties of triphosphate-dependent nicotinate phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 1478: 211-20.

Dziewit L., Adrian Cegielski, Krzysztof Romaniuk, Witold Uhrynowski, Antoni Szych, Pawel Niesiobedzki, Magdalena J. Zmuda-Baranowska, Marek K. Zdanowski, Dariusz Bartosik. (2013). Plasmid diversity in arctic strains of *Psychrobacter* spp. *Extremophiles*, 17:433–444.

Endrizzi J. A., Kim H., Anderson P. M. y Baldwin E. P. (2004). Crystal structure of *Escherichia coli* cytidine triphosphate synthetase, a nucleotide-regulated glutamine amidotransferase/ATP-dependent amidoligase fusion protein and homologue of anticancer and antiparasitic drug targets. *Biochemistry*, 43: 6447-63.

Enos-Berlage J. L., Langendorf M. J. y Downs D. M. (1998). Complex metabolic phenotypes caused by a mutation in *yjgF*, encoding a member of the highly conserved YER057c/YjgF family of proteins. *J Bacteriol*, 180: 6519-28.

Enright M. C., Carter P. E., Maclean I. A. y McKenzie H.. (1994). Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 387–391.

Falasca P., Evangelista G., Cotugno R., Marco S., Masullo M., De Vendittis E. y Raimo G. (2012). Properties of the endogenous components of the thioredoxin system in the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Extremophiles.*, 16: 539-52.

Feller G. (2007). Life at low temperatures: is disorder the driving force?. *Extremophiles.* 11, 211-216.

Ferreira F. y Straus N. A. (1994). Iron deprivation in cyanobacteria. *J Appl Phyc*, 6: 199-210.

Franks F., S. F. Mathias and R. H. Hatley (1990). Water, temperature and life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 326, 517-533.

Franks F. (1995). Protein destabilization at low temperatures. *Adv. Protein Chem.* 46, 105-139.

Fredrickson J. K., Romine M. F., Beliaev A. S., Auchtung J.M., Driscoll M.E., Gardner T. S., Nealson K. H., Osterman A. L., Pinchuk G., Reed J. L., Rodionov D. A., Jorge L. M. Rodrigues, Saffarini D. A., Serres M. H., Spormann A. M., Zhulin I. B. y Tiedje J. M.. (2008). Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Microbiol*, 6: 592–603.

Fukuoka H., Wada T., Kojima S., Ishijima A. y Homma M. (2009). Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. *Molecular Microbiology.* 71: 825-835.

Galdiero S., Falanga A., Cantisani C., Tarallo R., Della Pepa M. E., Oriano V. y Galdiero M. (2012). Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Curr Protein Pept Sci.*, 13: 843–854.

García-Descalzo L., Alcazar A., Baquero F. y Cid C. (2011). Identification of in vivo HSP90-interacting proteins reveals modularity of HSP90 complexes is dependent on the environment in psychrophilic bacteria. *Cell Stress Chaperones*, 16: 203-18.

García-Descalzo L., Alcazar A., Baquero F. y Cid C. (2013). Biotechnological applications of cold-adapted bacteria. En *Extremophiles: Sustainable and Biotechnological Implications*. Om V. Singh. Pp. 159-174. Wiley-Blackwell, New Jersey.

Gao H., Yang Z. K., Wu L., Thompson D. K. y Zhou J. (2006). Global transcriptome analysis of the cold shock response of *Shewanella oneidensis* MR-1 and mutational analysis of its classical cold shock proteins. *J Bacteriol.* 188: 4560-4569.

Garrity G. M. y J. G. Holt. (2001). The road map to the manual. In: Boone D. R., Castenholz R. W. y Garrity G. M. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 1: 119–155

Gasteiger, E., Jung, E. and Bairoch, A. (2001) Swiss-Prot: connecting biological knowledge via a protein database. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 3: 47-55

Georlette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., Marx J. C., Sonan G., Feller G. y Gerday C. (2004). Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 25-42.

Gerdes S. Y., Kurnasov O. V., Shatalin K., Polanuyer B., Sloutsky R., Vonstein V., Overbeek R. y Osterman A. L. (2006). Comparative Genomics of NAD Biosynthesis in Cyanobacteria. *J Bacteriol.*, 188: 3012–3023.

Gerike U., W. Hough D. W., J. Russell N. J., L. Dyall-Smith M. L. y J. Dansonl M. J. (1998). Citrate synthase and 2-methylcitrate synthase: structural, functional and evolutionary Relationships. *MiCrObiology*, 144: 929-935.

Ghisla S. y Thorpe C. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur J Biochem.*, 271: 494-508.

Gill R. T., DeLisa M. P., Shiloach M., Holoman T. R. y Bentley W. E. (2000). OmpT expression and activity increase in response to recombinant chloramphenicol acetyltransferase overexpression and heat shock in *E. coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 2: 283-9.

Goto M., Omi R., Nakagawa N., Miyahara I. y Hirotsu K. (2004). Crystal structures of CTP synthetase reveal ATP, UTP, and glutamine binding sites. *Structure.*, 12(8):1413-23.

Goulhen F., Dé E., Pages J. M. y Bolla J. M. (2004) Functional refolding of the *Campylobacter jejuni* MOMP (major outer membrane protein) porin by GroEL from the same species. *Biochem J*, 378: 851–856.

Gragerov A., Nudler E., Komissarova N., Gaitanaris G. A., Gottesman M. E. y Nikiforov V. (1992). Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Eschechiria coli*. *Prco. Natl. Acad. Sci.* 89: 10341-10344.

Grimek T. L. y Escalante-Semerena J. C. (2004). The *acnD* Genes of *Shewanella oneidensis* and *Vibrio cholerae* Encode a New Fe/S-Dependent 2-Methylcitrate Dehydratase Enzyme That Requires *prpF* Function In Vivo. *J Bacteriol.*, 186: 454–462.

Gross M. (2001) Life on the Edge. Amazing creatures thriving in extreme environments, pp. 1-11. Plenum Press, New York.

Gualerzi CO, Giuliodori AM, Pon CL. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol.* 15; 331(3):527-39.

Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R. y Aebersold R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.*, 19: 1720-30.

Han G. , Sreenivas A., Choi M., Chang Y., Martin S. S., Baldwin E. P. y Carman G. M. (2005). Expression of Human CTP Synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Phosphorylation by Protein Kinase A. *J Biol Chem.*, 280: 38328–38336.

Horikoshi K. (2011). Extremophiles Handbook. Springer-Verlag, Tokyo.

Goldgur Y., Mosyak L., Reshetnikova L., Aniklova V. Lavrik O., Khodyreva S. y Safro M. (1997). The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from thermus thermophilus complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure.* 5: 59-68.

Harlt F. U. y Hayer-Harlt M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 295: 1852-1858.

Hau H. H. y Granlick J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61: 237-258.

Hébraud M. y Potier P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J. mol. Microbiol. Biotechnol.*, 1: 211-219.

Hecker M. y Völker U. (1990). General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Ecol.*, 74: 197-214.

Hegde P. S., White I. R. y Debouck C. (2003). Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr Opin Biotechnol.*, 14: 647-51.

Hendrick J. P. y Hartl F. U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 62: 349–384.

Hirokawa G., Kiel M. C., Muto A., Kawai G., Igarashi K., Kaji H. y Kaji A. (2002). Binding of ribosome recycling factor to ribosomes, comparison with tRNA. *J Biol Chem.*, 277: 35847-52.

Hochachka P. W. y Somero G. N. (2002). Biochemical Adaptation: Mechanisms and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press.

Holm L. y Sander C. (1997). An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins.*, 28: 72-82.

Hough D. W. y Danson M. J. (1999). Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 39-46.

Huston W. M., Tyndall J. D., Lott W. B., Stansfield S. H. y Timms P. (2011). Unique residues involved in activation of the multitasking protease/chaperone HtrA from *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One.*, 6: e24547.

Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M. C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Meshi T., Ishikawa M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell*, 39: 282–291.

Ingram-Smith C., Martin S. R., Smith K. S. (2006). Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends Microbiol.*, 14: 249-53.

Irwin J. A. and Baird A. W. (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*, 57: 348-354.

Iwasaki S., Kobayashi M., Yoda M., Sakaguchi Y., Katsuma S., Suzuki T., Tomari Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell*, 39: 292–299.

Iyer L. M., Leippe D. D., Koonin E. V. y Aravind L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology*, 146: 11–31.

Janosi L., Shimizu I. y Kaji A. (1994). Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91: 4249-53.

Johnson-Winters K., Purpero V. M., Kavana M. y Moran G. R. (2005). Accumulation of multiple intermediates in the catalytic cycle of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis*. *Biochemistry.*, 44: 7189-99.

Jones P. G, VanBogelen R. A. y Neidhardt F. C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 169: 2092-5.

Jørgensen C. M., Hammer K., Jensen P. R. y Martinussen J. (2004). Expression of the pyrG gene determines the pool sizes of CTP and dCTP in *Lactococcus lactis*. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2438–2445.

Karan R., Capes M. D. y DasSarma S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*, 8: 4.

Kedzierska S., Akoev V., Barnett M. E. y Zolkiewski M. (2003). Structure and function of the middle domain of ClpB from *Escherichia coli*. *Biochemistry.*, 42: 14242-8.

Keith K. E., Killip L., He P., Moran R. G., y Valvano M. A. (2007). *Burkholderia cenocepacia* C5424 Produces a Pigment with Antioxidant Properties Using a Homogentisate Intermediate. *J Bacteriol.*, 189: 9057–9065.

Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37: 387-392.

Kim D. Y., Kim D. R., Ha S. C., Lokanath N. K., Lee C. J., Hwang H. Y. y Kim K. K. (2003). Crystal structure of the protease domain of a heat-shock protein HtrA from *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem.*, 278: 6543-51.

Kim J. J. P. y Miura R. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. *Eur. J. Biochem.* 271: 483–493.

- Kiss E., Huguet T., Poinot V. y Batut J. (2004). The *typA* gene is required for stress adaptation as well as for symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* 1021 with certain *Medicago truncatula* lines. *Mol Plant Microbe Interact.*, 17: 235-44.
- Koutsioulis D., Wang E., Tzanodaskalaki M., Nikiforaki D., Deli A., Feller G., Heikinheimo P. y Bouriotis V. (2008). Directed evolution on the cold adapted properties of TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Eng Des Sel.*, 21: 319-27.
- Kovács E., Sun Z., Liu H., Scott D. J., Karsisiotis A. I., Clarke A. R., Burston S. G. y Lund P. A. (2010). Characterisation of a GroEL single-ring mutant that supports growth of *Escherichia coli* and has GroES-dependent ATPase activity. *J Mol Biol.*, 396: 1271-83.
- Krewulak K. D. y Vogel H. J. (2011). TonB or not TonB: is that the question? *Biochem Cell Biol.*, 89: 87-97.
- Krishnan K. y Flower A. M. (2008). Suppression of DeltabipA phenotypes in *Escherichia coli* by abolishment of pseudouridylation at specific sites on the 23S rRNA. *J Bacteriol.*, 190: 7675-83.
- Krojer T., Garrido-Franco M., Huber R., Ehrmann M. y Clausen T. (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature.*, 416: 455-9.
- Kvint K., Nachin L., Diez A. y Nyström T. (2003) .The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol.*, 6: 140-5.
- Laksanalamai P. y Robb F. T. (2004) Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles.* 8:1-11.

Lamanna C., Mallettem F. and Zimmerman L. N. (1973). *Basic Bacteriology*, 4th edn. Baltimore: Williams & Wilkins.

Langer T., Lu C., Echols H., Flanagan J., Hayer M. K. y Hartl F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature.*, 256: 683-689.

Leblanc L., Leboeuf C., Leroi F., Hartke A. y Auffray Y. (2003). Comparison between NaCl tolerance response and acclimation to cold temperature in *Shewanella putrefaciens*. *Current Microbiology*, 46: 157-162.

Lee J. W. y Helmann J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals.*, 20: 485-99.

Lee S., Sowa M. E., Choi J. M. y Tsai F. T. (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. *J Struct Biol.*, 146: 99-105.

Li W., Trabuco L. G., Schulten K. y Frank J. (2011). Molecular dynamics of EF-G during translocation. *Proteins.*, 79: 1478–1486.

Liberek, K., Lewandoska, A. y Zietkiewicz, S. (2008) Chaperones in control of proteína disaggregation. *EMBO J.*, 27: 328-335.

Lin Y-S. (2008). Using a strategy based on the concept of convergent evolution to identify residue substitutions responsible for thermal adaptation. *Proteins*, 73: 53-62.

Lindner H. A., Lunin V. V., Alary A., Hecker R., Cygler M. y Ménard R. (2003). Essential roles of zinc ligation and enzyme dimerization for catalysis in the aminoacylase-1/M20 family. *J Biol Chem.*, 278: 44496-504.

Liochev S. I., Hausladen A. y Fridovich I. Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96: 3537-9.

Loprasert S., Whangsuk W., Dubbs J. M., Sallabhan R., Somsongkul K., y Mongkolsuk S. (2007). HpdR Is a Transcriptional Activator of *Sinorhizobium meliloti* hpdA, Which Encodes a Herbicide-Targeted 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *J Bacteriol.*, 189: 3660–3664.

Lu J. y Holmgren A. (2013). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* pii: S0891-5849(13)00380-8.

MacDonell, M. T. y Colwell, R. R. (1985). Phylogeny of the *Vibrionaceae* and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Bacteriol* , 6; 171–182.

MacElroy R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Byosystems.* 6, 74-75.

Madan D., Lin Z., Rye H. S. (2008). Triggering protein folding within the GroEL-GroES complex. *J Biol Chem.*, 283: 32003-13.

Maier T., Schmidt A., Güell M., Kühner S., Gavin A. C., Aebersold R. y Serrano L. Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Mol Syst Biol.*, 7: 511.

Makhnevych T. y Houry W. A. (2013). The control of spindle length by Hsp70 and Hsp110 molecular chaperones. *FEBS Lett.*, 587: 1067-72.

Merlino A., Russo Krauss I., Castellano I., De Vendittis E., Rossi B., Conte M., Vergara A. y Sica F. (2010). Structure and flexibility in cold-adapted iron superoxide dismutases: the case of the enzyme isolated from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Struct Biol.*, 172: 343-52.

Metpally R. P. y Reddy B. V. (2009). Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC Genomics.* 8: 10-11.

Ming-Feng Lu, Hong-Fang Ji, Ting-Xuan Li, Shou-Kai Kang, Yue-Jie Zhang, Jue-Fei Zheng, Tian Tian, Xi-Shuai Jia, Xing-Ming Lin y Hong-Yu Zhang. (2013). Reconstructing a Flavodoxin Oxidoreductase with Early Amino Acids. *Int J Mol Sci.*, 14: 12843–12852.

Mirus O., Strauss S., Nicolaisen K., von Haeseler A. y Schleiff E. (2009). TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria. *BMC Biology*, 7: 68.

Misal S. A., Bajoria V. D., Lingojar D. P. y Gawai K. R. (2013). Purification and characterization of nitroreductase from red alkaliphilic bacterium *Aquiflexum* sp. DL6. *Prikl Biokhim Mikrobiol.*, 49 :249-54.

Miyake R., Kawamoto J., Wei Y. L., Kitagawa M., Kato I., Kurihara T. y Esaki N. (2007). Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. Strain Ac10, as the host. *Applied and Environmental Microbiology.* 73: 4849-4856.

Morita R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*. 39: 144-167.

Mogk A., Schlieker C., Strub C., Rist W., Weibezahn J. y Bukau B. Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *J Biol Chem.*, 278: 17615-24.

Muga A. y Moro F. (2008). Thermal adaptation of heat shock proteins. *Curr Protein Pept Sci.*, 9: 552-566.

Mootha V. K., Bunkenborg J., Olsen J. V., Hjerrild M., Wisniewski J. R., Stahl E., Bolouri M. S., Ray H. N., Sihag S., Kamal M., Patterson N., Lander E. S. y Mann M. (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell.*, 115: 629-40.

Myers C. R. y Nealson K. H. (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240: 1319-1321.

Nagano T., Kouji Kojima K., Hisabori T., Hayashi H., Morita E. H., Kanamori T., Miyagi T., Ueda T. y Nishiyama Y. (2012). Elongation Factor G Is a Critical Target during Oxidative Damage to the Translation System of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 287: 28697–28704.

Nakagawa S., Niimura Y., Miura K. y Gojobori T. (2010). Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107: 6382-7.

Naponelli V., Noiriél A., Ziemak M. J., Beverley S. M., Lye L., Plume A. M., Botella J. R., Loizeau K., Ravanel S., Rébeillé F., de Crécy-Lagard V. y Hanson A. D. (2008). Phylogenomic

and Functional Analysis of Pterin-4a-Carbinolamine Dehydratase Family (COG2154) Proteins in Plants and Microorganisms. *Plant Physiol.*, 146: 1515–1527.

Nie L., Wu G. y Zhang W. (2006). Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. *Biochem Biophys Res Commun.*, 339: 603-10.

Niwa T., Kanamori T., Ueda T. y Taguchi H. (2012). Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109: 8937-42.

Nedwell D. B. y Rutter M. (1994). Influence of temperature on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low temperature diminishes affinity for substrate uptake. *Appl Environ Microbiol.*, 60: 1984-92.

Nnyepi M. R., Yi Peng y Broderick J. B. (2007). Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: role of adhe and small molecules. *Arch Biochem Biophys.*, 459: 1–9.

Ogura T. y Wilkinson A. J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells.*, 6: 575-97.

Okamura-Ikeda K., Ohmura Y., Fujiwara K. y Motokawa Y. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *Eur. J. Biochem.*, 216: 539-548.

Owens R. M., Pritchard G., Skipp P., Hodey M., Connell S. R., Nierhaus K. H. y O'Connor C. D. (2004). A dedicated translation factor controls the synthesis of the global regulator. *Fis EMBO J.*, 23: 3375–3385.

Ozkanca R. y Flint K. P. (2002). The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett Appl Microbiol.*, 35: 533-7.

Palmer S. O., Rangel E. Y., Montalvo A. E., Tran A. T., Ferguson K. C. y Bullard J. M. (2013). Cloning and Characterization of EF-Tu and EF-Ts from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Res Int.*, 2013: 585748.

Pankiewicz K. W. y Goldstein B. M. (2003). Inosine monophosphate dehydrogenase A major therapeutic target. Washington, DC: *Oxford University Press*.

Panoff J. M., Corroler D., Thammavongs B. y Boutibonnes P. (1997). Differentiation between Cold Shock Proteins and Cold Acclimation Proteins in a Mesophilic Gram-Positive Bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of Bacteriology*, 179: 4451-4454.

Paredes DI, Watters K, Pitman DJ, Bystroff C, Dordick JS. (2011) Comparative void-volume analysis of psychrophilic and mesophilic enzymes: Structural bioinformatics of psychrophilic enzymes reveals sources of core flexibility. *BMC Struct Biol.* 20; 11:42.

Park E. S., Fenton W. A. y Horwich A. L. (2006). Disulfide formation as a probe of folding in GroEL–GroES reveals correct formation of long-range bonds and editing of incorrect short-range ones. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104: 2145-50.

Parsot C, Hamiaux C. y Page A-L (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion Systems. *Current Opinion in Microbiology* , 6: 7-14.

Paulick A., Koerdt A., Lassak J., Huntley S., Wilms I., Narberhaus F. y Thormann K. M. (2009). Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol Microbiol.*, 71: 836–850.

Pédelacq J. D., Waldo G. S., Cabantous S., Liong E. C. y Terwilliger T. C. (2005). Structural and functional features of an NDP kinase from the hyperthermophile crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Protein Sci.* 14: 2562-73.

Pedersen H. L., Willassen N. P. y Leiros I. (2009). The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 65: 84-92.

Perrody E., Cirinesi A. M., Desplats C., Keppel F., Schwager F., Tranier S., Georgopoulos C., Genevaux P. (2012). A Bacteriophage-Encoded J-Domain Protein Interacts with the DnaK/Hsp70 Chaperone and Stabilizes the Heat-Shock Factor σ^{32} of *Escherichia coli*. *PLoS Computational Biology*, 8: 1-15.

Pfennig P. L. y Flower A. M. (2001). BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature. *Mol Genet Genomics.*, 266: 313-7.

Phadtare S. (2004). Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 125-136.

Piette F, D'Amico S, Struvay C, Mazzucchelli G, Renaut J, Tutino ML, Danchin A, Leprince P, Feller G. (2010). Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Mol Microbiol.*, 76: 120-32.

Piette F., D'Amico S., Mazzucchelli G., Danchin A., Leprince P. y Feller G. (2011). Life in the cold: a proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3881-3.

Pimkin M. y Markham G. D. (2008). The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Mol Microbiol.*, 68: 342-59.

Prüss B. M. y Wolfe A. J. (1994). Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 12: 973-84.

Raimo G., Lombardo B., Masullo M., Lamberti A., Longo O. y Arcari P. (2004). Elongation factor Ts from the Antarctic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: biochemical characterization and cloning of the encoding gene. *Biochemistry.*, 43: 14759-66.

Rigal A., Bouveret E., Lloubes R., Lazdunski C. y Benedetti H. (1997). The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 179: 7274-9.

Rina M., Pozidis C., Mavromatis K., Tzanodaskalaki M., Kokkinidis M. y Bouriotis V. (2000). Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5. Properties and psychrophilic adaptations. *Eur. J. Biochem.*, 267:1230-1238.

Robin S., Togashi D. M., Ryder A. G., Wall J. G. (2009). Trigger factor from the psychrophilic bacterium *Psychrobacter frigidicola* is a monomeric chaperone. *Journal of Bacteriology*, 191: 1162-1168.

Rodionov D. A., Novichkov P. S., Stavrovskaya E. D., Rodionova I. A., Li X., Kazanov M. D., Ravcheev D. A., Gerasimova A. V., Kazakov A. E., Kovaleva G. Y., Permina E. A., Laikova O. N., Overbeek R., Romine M. F., Fredrickson J. K., Arkin A. P., Dubchak I., Osterman A. L., Gelfand M. S. (2011). Comparative genomic reconstruction of transcriptional networks controlling central metabolism in the *Shewanella* genus. *BMC Genomics*, 12: S3.

Rodrigues D. F. and Tiedje J. M. (2008). Coping with Our Cold Planet. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 1677-1686

Rodrigues J. L., Serres M. H. y Tiedje J. M. (2011). Large-Scale Comparative Phenotypic and Genomic Analyses Reveal Ecological Preferences of *Shewanella* Species and Identify Metabolic Pathways Conserved at the Genus Level. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 5352-5360.

Roman-Hernández G, Hou J. Y., Grant R. A., Sauer R. T. y Baker T. A. (2011). The Clps adaptor mediates targeted delivery of N-end-rule substrates to the AAA+ ClpAP protease. *Mol Cell*, 43: 217-228.

Rosenblum J. S. y Kozarich J. W. (2003). Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 7: 496-504.

Rossau R., Vanlandschoot A., Gillis M., y Deley J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(2): 310–319.

Rouf S. M., Ohara-Nemoto Y., Ono T., Shimoyama Y., Kimura S. y Nemoto TK. (2013). Phenylalanine 664 of dipeptidyl peptidase (DPP) 7 and Phenylalanine 671 of DPP11 mediate preference for P2-position hydrophobic residues of a substrate. *FEBS Open Bio.*, 3: 177-83.

Ruggiero I., Raimo G., Palma M., Arcari P. y Masullo M. (2007). Molecular and functional properties of the psychrophilic elongation factor G from the Antarctic Eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Extremophiles.* 11: 699-709.

Russell N. J. (1990). Cold adaptation of microorganisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 326: 595-611.

Russell N. J. (1992). Physiology and molecular biology of psychrophilic micro-organisms. In *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. pp.203-221. Chapman and Hall, New York.

Russell N. J. (1993). Biochemical differences between psychrophilic and psychrotolerant microorganisms. In *Trends in Microbiology Ecology*. Ed. Guerrero R., Pedros-Alio C. pp. 29-32. Madrid: Spanish Society for Microbiology.

Russell N. J. y Hamamoto T. (1998). Psychrophiles. In *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Ed. Horikoshi K. and Grant W. D. pp. 25-45. Wiley-Liss.

Russell N. J. (2000). Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*. 4: 83-90.

Sanderová H., Hůlková M., Malon P., Kepková M. y Jonák J. (2004). Thermostability of multidomain proteins: elongation factors EF-Tu from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus* and their chimeric forms. *Protein Sci.*, 13: 89-99.

Savelsbergh A., Rodnina M. V. y Wintermeyer W. (2009). Distinct functions of elongation factor G in ribosome recycling and translocation. *RNA.*, 15: 772-80.

Seibert C. M. y Raushel F. M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*. 44: 6383-91.

Siddiqui K. S. y Cavicchioli R. (2006). Cold-Adapted Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 403-433.

Singh A. K. y Shivaji S. (2010). A cold-active heat-labile t-RNA modification GTPase from a psychrophilic bacterium *Pseudomonas syringae* (Lz4W). *Res Microbiol.* 161: 46-50.

Sielaff B. y Tsai F. T. (2010). The M-domain controls Hsp104 protein remodeling activity in an Hsp70/Hsp40-dependent manner. *J Mol Biol.*, 402: 30-7.

Schmidt-Nielse S. (1902). Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 9, 145.

Schumann W. (2009). Temperature sensors of eubacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 67, 213-256.

Schmitz G., Downs D. M. (2004). Reduced transaminase B (IlvE) activity caused by the lack of yjgF is dependent on the status of threonine deaminase (IlvA) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 186: 803-810.:

Smith J. L. (2004). The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol.*, 30: 173-85.

Snider J., Thibault G. y Houry W. A. (2008). The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol.*, 9: 216.

Sousa M. C. y McKayCorresponding D. B. (2001). Structure of the Universal Stress Protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure*, 9: 1135-1141.

Spector M. P., DiRusso C. C., Pallen M. J., Garcia del Portillo F., Dougan G. y Finlay B. B. (1999). The medium-/long-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase (fadF) gene of *Salmonella typhimurium* is a phase 1 starvation-stress response (SSR) locus. *Microbiology.*, 145: 15-31.

Sprinzi M., Brock S., Huang Y., Milovnik P., Nanninga M., Nesper-Brock M., Rütthard H. y Szkaradkiewicz K. (2000). Regulation of GTPases in the bacterial translation machinery. *Biol Chem.*, 381: 367-75.

Stamnes M. A., Rutherford S. L. y Zuker C. S. (1992). Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends in Cell Biology*, 2: 272-276.

Steven B., Léveillé R., Pollard W. H. y L. G. Whyte L. G. (2006). Microbial ecology and biodiversity in permafrost. In *Extremophiles*. 10: 259-267. Caister Academic Press. Norfolk, UK.

- Storz G. e Imlay J. A. (1999). Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*, 2: 188-194.
- Su Jin Kim, Seung Chul Shin, Soon Gyu Hong, Yung Mi Lee, In-Geol Choi y Hyun Park (2012). Genome sequence of a novel member of the genus *Psychrobacter* isolated from Antarctic Soil. *Journal of Bacteriology*. p. 2403.
- Sukdeo N., Clugston S. L., Daub E., y Honek J. F. Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes. *Biochem J*, 384: 111–117.
- Summers M. L., Denton M. C., y McDermott R. T. (1999). Genes Coding for Phosphotransacetylase and Acetate Kinase in *Sinorhizobium meliloti* Are in an Operon That Is Inducible by Phosphate Stress and Controlled by PhoB. *J Bacteriol.*, 181: 2217–2224.
- Tadokoro A., Hayashi H., Kishimoto T., Makino Y., Fujisaki S. y Nishimura Y. (2004). Interaction of the Escherichia coli Lipoprotein N1pl with Periplasmic Prc (Tsp) Protease. *J. Biochem.*, 135: 185-191.
- Takeshita D. y Tomita K. (2010). Assembly of Q β viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and –Ts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107: 15733–15738.
- Taylor D. E. (1999). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.*, 7: 111-5.
- Teixeira-Gomes A. P., Cloeckert A. y Zygmunt M. S. (2000). Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun.*, 68: 2954-61.

Thomas T. y Cavicchioli R. (2000) Effect of Temperature on Stability and Activity of Elongation Factor 2 Proteins from Antarctic and Thermophilic Methanogens. *Journal of Bacteriology*. 182: 1328–1332.

Thompson A. D., Bernard S. M., Skiniotis G. y Gestwicki J. E. (2012). Visualization and functional analysis of the oligomeric states of *Escherichia coli* heat shock protein 70 (Hsp70/DnaK). *Cell Stress and Chaperones*, 17: 313-327.

Turick C. E., Beliaev A. S., Zakrajsek B. A., Reardon C. L., Lowy D. A., Poppy T. E., Maloney A. y Ekechukwu A. A. (2009). The role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in enhancement of solid-phase electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol Ecol.*, 68: 223-5.

Turner K. L., Doherty M. K., Heering H. A., Armstrong F. A., Reid G. A. y Chapman S. K. (1999). Redox properties of flavocytochrome c3 from *Shewanella frigidimarina* NCIMB400. *Biochemistry*, 38: 3302-3309.

Tkaczuk K. L., Shumilin I. A., Chruszcz M., Evdokimova E., Savchenko A. y Minor W. (2013). Structural and functional insight into the universal stress protein family. *Evolutionary Applications*, 6: 434–449.

Van Durme J., Maurer-Stroh S., Gallardo R., Wilkinson H., Rousseau F. y Schymkowitz J. (2009). Accurate Prediction of DnaK-Peptide Binding via Homology Modelling and Experimental Data. *PLoS Computational Biology*, 5: 1-9.

Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, Lies DP, Saffarini DA, MacGregor BJ, Ringelberg DB, White DC, Nishijima M, Sano H, Burghardt J, Stackebrandt E, Nealson KH. (1999).

Polyphasic taxonomy of genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 705-724.

Ventura M., Canchaya C., Zink R., Fitzgerald G. F. y van Sinderen D. (2004). Characterization of the groEL and groES loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol.*, 70: 6197-209.

Vickers T. J., Greig N. y Fairlamb H. A. (2004). A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101: 13186–13191.

Vogel C., Abreu Rde S., Ko D., Le S. Y., Shapiro B. A., Burns S. C., Sandhu D., Boutz D. R., Marcotte E. M. y Penalva L. O. (2010). Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol.*, 6: 400.

Wadskov-Hansen S. L., Willemoës M., Martinussen J., Hammer K., Neuhard J. y Larsen S. (2001). Cloning and verification of the *Lactococcus lactis* pyrG gene and characterization of the gene product, CTP synthase. *J Biol Chem.*, 276: 38002-9.

Wagner A. F.V., Frey M., Neugebauer F. A., Schaefer W. y Knappe J. (1992) The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 996-1000.

Walsh N. P., Alba B. M., Bose B., Gross C. A. y Sauer R. T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell.*, 113: 61-71.

Wang P. y Heitman J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biology*, 6: 226.

Wang Q., Hou Y., Qu J., Hong Y., Lin Y. y Han X. (2013). Molecular cloning, expression, purification and characterization of thioredoxin from Antarctic sea-ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. AN178. *Mol Biol Rep.* [Epub ahead of print]

Wilfried A. C., Pühle A. y Kalinowski J. (2002). Identification of Two prpDBC Gene Clusters in *Corynebacterium glutamicum* and Their Involvement in Propionate Degradation via the 2-Methylcitrate Cycle. *J Bacteriol.*, 184: 2728–2739.

Wynn-Williams DW. (1990). Ecological aspects of Antarctic microbiology. *Adv. Microbial Ecol.* 11, 71-146.

Wu S., Ge X., Lv Z., Zhi Z., Chang Z. y Zhao XS. (2011). Interaction between bacterial outer membrane proteins and periplasmic quality control factors: a kinetic partitioning mechanism. *Biochem J.*, 438: 505-11.

Wu L., Wang J., Tang P., Chen H. y Gao H. (2011). Genetic and Molecular Characterization of Flagellar Assembly in *Shewanella oneidensis*. *PLoS One*, 6: e21479.

Yang W. L., McDonough V. M., Ozier-Kalogeropoulos O., Adeline M. T., Flocco M. T., Carman G. M. (1994). Purification and characterization of CTP synthetase, the product of the URA7 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.*, 33: 10785-93.

Yang Y., Harris D. P., Luo F., Wu L., Parsons A. B., Palumbo A. V. y Zhou J. (2008). Characterization of the *Shewanella oneidensis* Fur gene: roles in iron and acid tolerance response. *BMC Genomics.*, 9: S11.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S. y Madden T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13: 134.

Zhou X., Cahoon M., Rosa P. y Hedstrom L. (1997). Expression, purification, and characterization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem*, 272: 21977-81.

